



De la découverte d'un actinoptérygien sémionotiforme du Jurassique de France à l'étude histologique fine des écailles ganoïdes

René-Paul Georges Eustache

► To cite this version:

René-Paul Georges Eustache. De la découverte d'un actinoptérygien sémionotiforme du Jurassique de France à l'étude histologique fine des écailles ganoïdes. Sciences du Vivant [q-bio]. 2016. hal-01655457

HAL Id: hal-01655457

<https://ephe.hal.science/hal-01655457>

Submitted on 4 Dec 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté par EUSTACHE René-Paul

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE : De la découverte d'un actinoptérygien sémionotiforme du Jurassique de France à l'étude histologique fine des écailles ganoïdes

Soutenu le 7 Décembre 2016 devant le jury suivant :

COUETTE Sébastien - Président
CLEMENT Gaël - Tuteur scientifique
MEUNIER François J. – Cotuteur scientifique
GODINOT Marc – Tuteur pédagogique
CUNY Gilles – Rapporteur
CAVIN Lionel – Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Tuteurs scientifiques : CLEMENT Gaël (a), MEUNIER François J. (b)

(a) Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR 7207, Centre de Recherche sur la Paléobiodiversité et les Paléoenvironnements, (CR2P), Paris, France (directeur CRASQUIN Sylvie)

(b) Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR 7208, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), Paris, France (directrice DUFOUR Sylvie)

Tuteur pédagogique : GODINOT Marc, Laboratoire d'Evolution des Primates (directeur GODINOT Marc) Ecole Pratique des Hautes Etudes (Sciences de la Vie et de la Terre)

A ma femme,
avec tout mon amour



« Νομίζουνσι δε και των ιχθυων τον καλομενον λεπιδωτον »
« On tient également pour sacré, parmi les poissons, celui qu'on appelle *Lepidotes* »

Histoires d'Hérodote, livre II 72

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je remercie Éric Buffetaut qui m'a orienté vers l'Ecole Pratique des Hautes Etudes. Grâce à cette école, amateur passionné mais sans formation de base en Sciences de la Vie et de la Terre, j'ai pu acquérir de nouvelles connaissances et aborder durant mes loisirs la paléontologie d'une manière plus scientifique et plus riche que la seule recherche de fossiles sur le terrain.

Merci à Marc et Gaël pour leur grande disponibilité et la confiance qu'ils m'ont accordée en acceptant d'être respectivement mon tuteur pédagogique et mon tuteur scientifique. Merci à vous pour votre patience, vos conseils bienveillants et vos nombreux encouragements. Grâce à vous j'ai eu le loisir d'étudier, selon mon souhait et avec les moyens techniques du Muséum, non pas un primate ou un coelacanthé, objets privilégiés de vos recherches, mais le spécimen incomplet d'un obscur actinoptérygien sé-mionotiforme aux relations phylogénétiques « douteuses ». Ce choix était discutable au plan scientifique mais il me tenait à cœur d'étudier le spécimen que j'ai eu la chance de découvrir, en tant qu'amateur, dans les falaises du Bec de Caux en 2008.

François, merci à toi pour nos discussions si passionnantes, ton soutien inconditionnel et tes encouragements. Grâce à toi j'ai découvert l'histologie et je reste encore émerveillé par la beauté et la richesse des observations microscopiques de lames minces.

Merci à toi Lionel pour nos échanges fort intéressants et les nombreux conseils prodigués aux plans ostéologique et phylogénétique. J'espère que tu trouveras un intérêt pratique à l'emploi de la nouvelle méthode d'étude des microtubercules que j'ai mis au point !

Jean Dejax, merci pour l'accès au microscope optique du MNHN, pour ta disponibilité et ta gentillesse.

Merci également aux autres contributeurs de ce projet de recherches : Jean-Yves Sire de l'Institut de Biologie Paris Seine de l'Université Paris VI pour les conseils prodigués et les axes d'étude suggérés, Yann Girard du laboratoire des Matériaux et Phénomènes Quantiques de l'Université Paris VII pour les expériences d'AFM, Fabrice Monti du laboratoire de Microfluidique de l'ESPCI pour les mesures de rugosimétrie en interférométrie de Michelson, Guilhem Simon du laboratoire MONARIS de l'Université Paris VI pour les premiers essais prometteurs en microscopie Raman.

Merci aux autres personnes du MNHN et de l'EPHE avec qui j'ai interagit et qui m'ont apporté leur aide durant ces années, leur nombre important m'empêche de les citer.

Enfin un grand merci à ma femme, Anne-France pour ses dessins qui illustrent les ossements de ma découverte, et aussi et surtout pour sa grande patience et son indulgence !!

De la découverte d'un actinoptérygien sémionotiforme du Jurassique de France à l'étude histologique fine des écailles ganoïdes.

René-Paul EUSTACHE

RESUME

La découverte d'un spécimen sub-complet d'actinoptérygien sémionotiforme dans les falaises du Bec de Caux (76) en novembre 2008, m'a poussé à entreprendre des recherches sur l'histologie et l'ornementation des écailles ganoïdes.

Il s'agit d'écailles osseuses recouvertes d'une couche d'émail, la ganoïne. Elle est ornée de microtubercules, reliefs microscopiques dont l'agencement varie en fonction des espèces.

Une première partie est consacrée à l'étude histologique des écailles du spécimen que j'ai découvert. Peu vascularisées, elles présentent des traces de dentine au niveau de l'*initium* et de manière inhomogène à l'interface avec la ganoïne. Elles sont parcourues par des *canaliculi* de Williamson dont certaines des terminaisons sont en connexion avec la dentine. Ils sont issus de cellules spécialisées de nature osseuse et leur interaction avec la dentine apparaît surprenante. Cela m'a conduit à revisiter la notion de « canal vasculaire de Williamson » introduite par Ørvig.

Dans la deuxième partie je présente une nouvelle méthode d'étude des microtubercules. Celle-ci est basée sur l'observation en microscopie optique par contraste de phase de répliques de la surface d'écailles (peels). J'ai élaboré un traitement semi-automatisé des images numériques afin d'extraire des descripteurs quantitatifs de l'ornementation. Elle présente de nombreux avantages au regard de la méthode précédemment développée, basée sur l'observation directe des écailles en microscopie électronique à balayage. Elle s'affranchit de l'étape de prélèvement d'une écaille. Elle est également plus robuste et permet de traiter un grand nombre de microtubercules dans le cadre d'une analyse statistique affinée.

J'illustre l'intérêt de ma méthode à travers quelques exemples d'étude de l'ornementation d'écailles actuelles et fossiles. Enfin je conclus en proposant une fonction nouvelle pour cette ornementation microscopique. Ces reliefs pourraient participer au renforcement de la résistance mécanique de l'écaille en améliorant l'adhésion des différentes strates de ganoïne entre elles.

Mots-clefs : *Lepidotes*, écaille, ganoïne, microtubercule, histologie, peel.

Table des matières

Préambule	7
Introduction.....	11
<i>Description de la découverte du fossile et présentation de ses relations phylogénétiques.</i>	11
<i>Description sommaire du spécimen « JRE.2008 »</i>	12
<i>Discussion des affinités avec †M. lennieri et †L. leedsi.</i>	13
<i>Conclusions</i>	17
Première partie : Etude histologique des écailles et d'un os dermique	18
<i>Matériel et méthodes</i>	18
<i>Rappels historiques (histologie)</i>	19
<i>Etude histologique des écailles du sémionotiforme JRE.2008.</i>	29
<i>Description générale de la structure histologique des écailles.</i>	29
<i>Caractéristiques histologiques remarquables et implications.</i>	32
<i>Canaliculi de Williamson et canaliculi de Williamson de type II</i>	32
<i>Agencement de la dentine.</i>	35
<i>Mise en évidence de stries sur les fibres de Sharpey.</i>	46
<i>Conclusions, relations phylogénétiques et perspectives.</i>	50
Deuxième partie : Etude de l'ornementation des écailles ganoïdes.....	53
<i>Historique</i>	53
<i>Mise au point d'une nouvelle méthode quantitative d'étude des microtubercules.</i>	56
<i>Partie A. Réalisation de répliques de surface et observation en microscopie optique</i>	61
<i>Partie B. Etude quantitative de l'ornementation des microtubercules avec « ImageJ »</i>	63
<i>Méthode de mesure semi-automatique des microtubercules.</i>	66
<i>Validité de la méthode : Comparaison avec d'autres méthodes d'observation.</i>	68
Applications – Résultats.....	71
<i>Etude de spécimens actuels des collections du MNHN</i>	71
<i>Etude de spécimens fossiles.</i>	75
Discussions – Interprétations	78
<i>Intérêt en systématique</i>	78
<i>Intérêt au plan paléo-biologique.</i>	79
<i>Fonction des tubercules</i>	79
<i>Morphogénèse</i>	81
Conclusions & Perspectives	83
Bibliographie.....	85
FIGURES.	99
TABLEAUX	166
ANNEXES.....	173

Préambule

Ce mémoire est l'achèvement d'une enquête démarrée en Novembre 2008, suite à ma découverte des restes d'un poisson fossile dans les falaises du Bec de Caux (76).

Passionné de fossiles et inscrit à un club d'amateurs de paléontologie, « La Pierre Conchoise », j'ai eu l'opportunité de découvrir à l'affleurement d'une falaise d'argile, située en bord de mer, deux petits fossiles de forme losangique et d'un beau noir brillant. Ces objets singuliers qui m'étaient alors totalement inconnus, ont éveillé ma curiosité.

Une première identification de ces cailloux fut faite au sein de « La Pierre Conchoise » : ces objets étranges seraient en fait des écailles de *Lepidotes*, un poisson fossile du mésozoïque, bien connu des paléontologues amateurs.

De retour sur les lieux, enthousiasmé par cette première découverte et armé de persévérance, je réussis à extraire de l'argile sur plusieurs week-ends, dans des conditions souvent pénibles à cause du froid et de l'humidité de l'hiver, et des outils rudimentaires à ma disposition, près de huit cents écailles de formes diverses ainsi que de nombreux ossements.

Cette fois, rendez-vous est pris avec un paléontologue professionnel, E. Buffetaut, afin de confirmer la première identification. S'agit-il des restes d'un seul animal ou bien d'un amas provenant de plusieurs espèces ? E. Buffetaut confirme l'attribution des restes à un poisson fossile apparenté aux *Lepidotes* et m'oriente vers L. Cavin, paléontologue au muséum de Genève, spécialiste de ce groupe de poissons fossiles.

Ma première intention est de pouvoir mettre un nom précis sur mon spécimen. Le genre *Lepidotes* est en effet connu pour être polyphylétique. Un groupe fourre-tout, regroupant de nombreuses espèces fossiles, dont les parentés phylogénétiques sont parfois discutables.

L'abondance de mes écailles, leurs formes variées si singulières, très différentes de celles des poissons actuels que l'on trouve sur les étals, leur surface d'un beau noir brillant qui n'est pas sans rappeler l'éclat des bijoux, m'incitent à engager des recherches spécifiques dans ce domaine.

J'apprends qu'il s'agit d'écailles ganoïdes (du grec *Ganos*, brillant). Elles ont été nommées ainsi à cause de leur structure particulière. Leur surface externe est en effet recouverte d'une couche d'email caractéristique, la ganoïne. Cette couche très dure, hyper-minéralisée est à l'origine de leur éclat brillant. Leur constitution robuste est très différente de celle des écailles élasmoïdes généralement observées chez les poissons de nos mers et rivières actuelles, bien plus flexibles et légères.

Le genre *Lepidotes* avec sa belle livrée d'écailles ganoïdes a été décrit et nommé par Louis AGASSIZ au XIXème siècle. Dans son livre « Recherches sur les poissons

fossiles », 1833-1843, le savant suisse rappelle la perplexité des naturalistes de l'époque vis-à-vis des premières découvertes. Il écrit :

« M. Ruppel est le premier naturaliste qui ait connu et décrit ce fossile (Lepidotus) ; il en a même publié une planche, en 1829, (...) Sa description, quoique très-exacte, rappelle cependant si bien l'ignorance complète où l'on était à cette époque, sur une grande division du règne animal dont nous connaissons des centaines d'espèces, que je ne puis m'empêcher d'en donner ici la traduction complète : « cuirasse remarquable d'un animal fossile indéterminable, probablement de la classe des reptiles »

L'identification de mes objets singuliers à des écailles de poissons n'était donc pas si évidente à faire, même pour un naturaliste ! Nous la devons à L. Agassiz. Cette « cuirasse remarquable », constituée d'écailles ganoïdes juxtaposées, évoque un rôle de protection probablement fort utile à ces poissons dans les mers anciennes infestées par des reptiles marins. L'organisation de la structure interne des écailles, en lien avec leur fonction de protection, a d'ailleurs été étudiée récemment par les scientifiques. Elle est faite de plusieurs couches de différentes rigidités, hiérarchisées à la manière d'un matériau composite. L'étude de cette organisation complexe s'avère être une source d'inspiration pour concevoir de nouveaux matériaux à la fois très rigides et plus résistants aux chocs. Ces travaux m'interpellent en tant qu'ingénieur impliqué dans la mise au point de nouveaux matériaux.

L'excellente qualité de préservation de mes écailles permet d'observer de nombreux éléments de leur structure interne en microscopie optique au moyen de lames minces et d'acquérir des données histologiques exploitables au plan systématique. Ces données seront également utiles pour mieux connaître la physiologie de mon spécimen, son âge et sa croissance en lien avec son environnement.

Enfin ces écailles si particulières présentent à la surface de la ganoïne une ornementation, visible uniquement au microscope, constituée d'une myriade de tubercules de dimensions « microscopiques ». Ces tubercules ne sont pas répartis au hasard. Ils forment des motifs géométriques en points dont la disposition est similaire à celle obtenue par des phénomènes physico-chimiques d'auto-organisation connus sous le nom de Turing Pattern. Là encore le physico-chimiste que je suis s'interroge sur le rôle possible des contraintes architecturales et de l'influence de phénomènes physico-chimiques d'auto-organisation vis-à-vis de cette morphogénèse.

Cette ornementation a été observée pour la première fois à l'aide d'un microscope électronique à balayage. D'après Gayet et Meunier qui ont étudié ses variations sur de nombreuses espèces actuelles et fossiles, elle serait un signal exploitable au plan systématique, et utile à l'identification d'écailles isolées ou de spécimens incomplets. L'étude de l'ornementation microscopique de mes écailles m'apparaît donc intéressante pour mieux identifier mon spécimen malheureusement incomplet. L'accès à un microscope électronique à balayage n'est pas chose aisée pour un amateur.

Existerait-il une méthode alternative d'observation de cette ornementation qui me soit plus facilement accessible ? Fort d'une expérience de plusieurs années au sein d'un laboratoire d'analyse, j'ai eu l'idée d'expérimenter sur mon matériel la méthode historique des répliques de surface et de leur observation en microscopie optique. La technique des « peels », élaborée au début des années 1900 avec l'utilisation des premières matières plastiques sous forme liquide (collodions), a eu un grand succès en paléobotanique notamment pour l'étude des épithéliums de feuilles fossiles. La technique s'est ensuite améliorée avec l'utilisation de films d'acétate de cellulose, puis son usage est tombé en désuétude avec l'arrivée des microscopes électroniques à balayage permettant des observations de surface à plus fort grossissement.

Mes premiers essais de réplique de surface d'écailles ont été réalisés à la maison avec du film alimentaire étirable. Ces répliques montées entre lame et lamelle sur un vieux microscope « Nachet » m'ont permis de réaliser mes premières observations de l'ornementation microscopique d'écailles. Malheureusement le film utilisé avait un comportement trop élastique, les empreintes des tubercules n'étaient pas très marquées et s'effaçaient au cours du temps. Finalement, après de nombreuses investigations, car très peu de chercheurs utilisent actuellement la méthode des « peels », je réussis à trouver des films plastiques spécialement dédiés à la réalisation de répliques de surface pour la microscopie. Puis j'ai mis au point une méthode quantitative d'étude de l'ornementation des microtubercules en utilisant des techniques d'analyse d'image. De manière inattendue ma méthode d'amateur présente de nombreux avantages vis-à-vis d'autres méthodes de caractérisation plus sophistiquées, comme les observations par microscopie électronique à balayage. Désormais l'étude scientifique quantitative de la micro-ornementation des écailles ganoïdes est accessible à tout amateur muni d'un microscope optique !

Dans quel cadre cette enquête a-t-elle été menée ? Au début, grâce à des échanges informels avec des paléontologues professionnels. L'envie et la passion grandissant, il m'est apparu nécessaire d'approfondir mes connaissances de base en paléontologie. J'ai sollicité le conseil de Mr. Buffetaut qui m'a orienté vers l'Ecole Pratique des Hautes Etudes. Des modules d'enseignement choisis à la carte et le système de parrainage de l'école, avec un tuteur pédagogique et un tuteur scientifique, m'ont été propices pour continuer mes recherches de manière plus structurée dans le cadre de la préparation du diplôme de l'EPHE. J'ai eu l'opportunité de me former aux techniques d'analyse d'image, de statistiques, de m'initier à la simulation numérique, mais aussi de m'initier à la biologie cellulaire et à la morphométrie, toutes connaissances utiles pour mes recherches. J'ai pu bénéficier également de conseils de spécialistes issus de domaines très variés pour approfondir des aspects transverses, par exemple au plan de l'ostéologie, de l'histologie, de la morphogénèse, de l'analyse d'image et de la simulation numérique. Le temps nécessaire à ces recherches a été pris sur mon temps de loisir avec de nombreuses périodes enthousiasmantes et riches d'une intense

activité, mais aussi une longue période d'accalmie quand l'excès de charge cognitive et le stress de la vie professionnelle furent momentanément trop présents pour que je puisse m'investir en parallèle sur un autre domaine, si intéressant soit-il.

Ce mémoire fait le point des travaux que j'ai réalisés et des principaux résultats obtenus à ce jour.

Après une brève introduction dédiée à la description et l'étude préliminaire du spécimen découvert par mes soins, je présenterai les résultats obtenus au plan histologique sur quelques-unes de ses écailles mises en collection au muséum d'histoire naturelle de Paris (MNHN). Puis dans une deuxième partie je décrirai la méthode que j'ai mise au point afin d'étudier plus facilement l'ornementation des microtubercules à la surface de la ganoïne. Je présenterai les premiers résultats obtenus sur des spécimens types des collections du MNHN ainsi que sur quelques autres échantillons fossiles. Une des finalités de ma nouvelle méthode est en effet d'aider à mieux identifier les écailles ganoïdes que l'on rencontre fréquemment « isolées » dans les terrains mésozoïques et dont l'attribution à une espèce, à un genre, voire à une famille s'avère souvent hasardeuse. Enfin je conclurai sur quelques pistes de compréhension des mécanismes biologiques et physico-chimiques qui pourraient être à l'origine de l'ornementation des microtubercules et sur leur fonction supposée, en introduisant des hypothèses nouvelles.

Ce travail n'est pas encore achevé. Le sera-t-il un jour ? Des jalons ont été posés qui ouvrent sur des questionnements nouveaux et de belles perspectives d'étude à venir !

Introduction

Description de la découverte du fossile et présentation de ses relations phylogénétiques.

J'ai découvert en 2008 un spécimen sub-complet de poisson sémionotiforme fossile, †*Lepidotes* sp., dans les falaises du Jurassique supérieur du Bec de Caux, près du Havre (76). Je l'ai extrait de la partie supérieure du membre médian des argiles d'Ecqueville, datées du Kimméridgien supérieur, et plus précisément de la zone d'ammonites à *Eudoxus*, sous-zone et horizon à *Orthocera* (Samson, et al., 1996). D'après l'étude des associations de foraminifères récoltées dans cette couche il s'agirait d'un milieu marin côtier peu profond, probablement de l'étage infralittoral (Samson, 1997).

Le matériel collecté se compose d'écailles ganoïdes et de divers ossements qui n'étaient pas en connexion. Une partie du matériel a été mis dans la collection de paléontologie au Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris (MNHN). Notamment sont en collection tous les ossements et les écailles sur lesquels j'ai réalisé les études histologiques et la mise au point de ma nouvelle méthode d'étude de la surface de la ganoïne, qui seront présentés dans ce mémoire. Ces divers échantillons sont référencés sous les numéros : Coll. EUSTACHE, N° MNHN.F.JRE 548 à 558. (LEPIDOTES ? LENNIERI sp. incert.), Niv. Kimméridgien sup., Loc. Cauville-sur-Mer (France). Le reste du matériel est actuellement dans ma collection personnelle sous la référence « JRE.2008 ». J'ai en effet le projet à long terme de poursuivre l'étude du spécimen et notamment l'étude des connexions entre les différentes écailles afin de pouvoir reconstituer ce « puzzle » fort complexe.

Bien que l'étude ostéologique du spécimen « JRE.2008 » ne fasse pas partie de mon projet d'études EPHE, j'en rappelle ici les principaux résultats et les conclusions obtenues à ce jour, afin que le matériel sur lequel j'ai réalisé l'étude histologique et la caractérisation des microtubercules soit décrit et identifié le plus précisément possible.

Ces premiers travaux menés en collaboration avec des paléontologues de Genève, Glasgow et Paris, ont confirmé l'attribution du spécimen au genre †*Lepidotes* (Agassiz, 1832) et son rapprochement avec l'espèce †*Lepidotes lennieri* (Sauvage, 1893), dont l'holotype a été découvert à la fin du XIX^{ème} siècle dans les couches du Kimméridgien inférieur du Cap de la Hève.

Le genre †*Lepidotes* tel que défini au début de mes recherches, peu après la découverte du spécimen, faisait partie d'un groupe éteint de poissons actinoptérygiens appartenant à la famille Semionotidae et à l'ordre Semionotiformes (Cavin *et al.*, 2003). L'espèce type était †*Lepidotes elvensis* (Blainville, 1818) mais d'après Lopez-Arbarello ce choix serait erroné et reviendrait aujourd'hui à †*Lepidotes gigas* (Lopez-Arbarello, 2012). Ce groupe rassemblait une trentaine d'espèces bien caractérisées au plan

ostéologique, de poissons d'eau douce et d'eau de mer à écailles ganoïdes avec des tailles variant de quelques centimètres à près de deux mètres. Néanmoins plus de cent cinquante espèces de †*Lepidotes* ont été nommées si l'on inclue les nombreux « *nomina dubia* » définis sur la base d'éléments fragmentaires isolés.

D'après Agassiz, qui est l'auteur du genre *Lepidotus* aujourd'hui renommé †*Lepidotes*, leur forme générale massive rappelle celle des grands cyprins (carpes) (Agassiz, 1833-1843). Il convient de noter que le genre †*Lepidotes* ainsi défini était un groupe reconnu par de nombreux paléontologues comme mal cerné sur le plan des relations phylogénétiques et assurément polyphylétique (Cavin, 2010). Par ailleurs, la position systématique de la famille Semionotidae au sein des Neopterygii restait délicate car discutée.

Une analyse cladistique menée par Lopez-Arbarello a conduit à revisiter en profondeur les relations phylogénétiques au sein du groupe Ginglymodi en 2012 (Lopez-Arbarello, 2012). En particulier le groupe †*Lepidotes* a été éclaté en plusieurs genres répartis dans différentes familles. De nouveaux groupes taxonomiques, dont le genre †*Macrosemimimus*, ont été créés. Il définit désormais des espèces particulières, comme †*Macrosemimimus lennieri*, anciennement attribuées au genre †*Lepidotes* (Schröder *et al.*, 2012). Enfin les contours de la famille Semionotidae et de l'ordre Semionotiformes ont été également redéfinis.

La position systématique nouvelle de †*Macrosemimimus lennieri*, l'espèce la mieux définie se rapprochant du spécimen « JRE.2008 » et du matériel « N° MNHN.F.JRE 548 à 558 » en collection au musée, est la suivante :

Classe : ACTINOPTERYGII, Cope 1887

Sous-classe : NEOPTERYGII Regan, 1923

Super-division : HOLOSTEI sensu Grande 2010

Division : GINGLYMODI Cope, 1872 (sensu Grande, 2010)

Ordre : SEMIONOTIFORMES Arambourg and Bertin, 1958 (sensu Lopez-Arbarello, 2012)

Famille : CALLIPURBECKIIDAE, Lopez-Arbarello, 2012

Genre : MACROSEMIMIMUS, Schröder, 2012

Espèce : †*Macrosemimimus lennieri* (Sauvage, 1893)

Description sommaire du spécimen « JRE.2008 »

Ossements caractéristiques

Le toit crânien est incomplet : il se compose d'une paire d'extrascapulaires se rejoignant au niveau de la ligne médiane, de deux post-temporaux, deux dermoptérotiques, du pariétal droit, de la partie postérieure du frontal droit, de deux dermosphénotiques, et deux supraorbitaux.

Les joues sont incomplètes : elles se composent notamment des deux opercules, du supracleithrum gauche et de la partie dorsale du supracleithrum droit, de la partie ventrale du sous-opercule droit, et des deux préopercules.

La dentition comporte notamment un vomer impair, un maxillaire édenté et le prémaxillaire droit.

Les FIGURES 1 à 4 présentent des vues éclatées et des essais de mise en connexion des ossements les plus caractéristiques. Leurs dimensions sont précisées dans le TABLEAU 4. La FIGURE 5 présente des fragments de la dentition.

Ecailles caractéristiques

Les écailles sont de formes très variées en fonction de leur position anatomique, comme le montre les FIGURES 6 à 8.

Les écailles présentent toutes une surface de ganoïne lisse, sans ornementation macroscopique visible et avec pour certaines quelques dentelures situées au niveau de leur bord postérieur ventral.

Les écailles caractéristiques des flancs sont de forme rectangulaire et présentent deux processus articulaires antéro-postérieurs marqués en position antérodorsale et antéroventrale. Il existe aussi une autre articulation dorso-ventrale additionnelle discrète, connue sous le nom d'articulation « peg and socket » (FIGURE 6).

Certaines des écailles faitières présentent une pointe postérieure (FIGURE 8).

Les écailles plus petites ne présentent généralement pas de processus articulaire marqué, elles proviennent probablement des régions de la queue et de la proximité des nageoires.

Les écailles attribuées à la région ventrale apparaissent relativement plus épaisses. Les deux processus articulaires antéro-postérieurs situés aux bords antéro-dorsal et antéro-ventral s'inclinent notablement en direction dorsale (FIGURE 7).

Discussion des affinités avec *†M. lennieri* et *†L. leedsi*.

L'espèce *†Macrosemimimus lennieri* est représentée par le spécimen du Kimméridgien inférieur du Havre (76) décrit sommairement par Sauvage en 1893 puis par Wenz en 1968 (Wenz, 1968) ; et également par deux spécimens du Kimméridgien d'Angleterre référencés BMNH P 25180 et BMNH P 34511 et conservés au National Museum of Natural History (NHM) à Londres.

Ces deux derniers spécimens sont anciennement connus sous la dénomination de *†Lepidotes tombsi* (Jain et Robinson, 1963). L'Holotype est le spécimen référencé MHNH 7267 du Muséum d'histoire naturelle du Havre, décrit par Sauvage puis Wenz (Schröder *et al.*, 2012).

L'espèce *†Lepidotes leedsi* est représentée par un spécimen incomplet décrit par Woodward en 1895, et provenant de l'Oxford Clay de Peterborough. Il s'agit du type, il est localisé au NHM sous la référence BMNH. P 6837 (Woodward, 1895). Un autre spécimen provenant de l'Oxford Clay de Peterborough, incomplet également et conservé au NHM sous le n° BMNH P 10907, a été rapporté à l'espèce *†L. leedsi* de par la très grande similitude de forme de plusieurs de ses ossements caractéristiques (Jain et Robinson, 1963).

Le genre *†Macrosemimimus* a été défini par Schröder à partir de la combinaison des caractères suivants :

- L'absence de ganoïne sur le crâne
- Des frontaux allongés caractérisés par une portion antéorbitale très étroite.
- Les frontaux possèdent également une lame antéorbitale dans le plan sagittal.
- Une paire d'extrascapulaires qui ne se rejoignent pas au niveau de la ligne médiane.
- Un maxillaire édenté
- Deux sous-orbitaux
- L'anneau de la série « circumorbitaire » ouvert antérieurement

L'espèce *†M. lennieri* a été définie par Schröder à partir des caractères additionnels suivants :

- Les os du crâne sont densément ornés de tubercules
- Les écailles lisses, présentent des dentelures sur leurs bords postérieurs
- Les extrascapulaires sont séparés de la ligne dorsale par une ou deux écailles
- Une dentition fortement broyeuse
- Des supracleithra présentant une zone postérodorsale crénelée.

Wenz mentionne que la suture interfrontale du spécimen MNHN 7267 du Havre est rectiligne (Wenz, 1968) tandis que Jain et Robinson mentionnent que celle des deux spécimens d'Angleterre est sinueuse (Jain et Robinson, 1963). Par ailleurs sur ces derniers la partie antérieure des frontaux est manquante et il n'est pas possible de dire si elle se rétrécit de manière brusque en avant de l'orbite et si elle présente une lame antérieure sagittale comme chez le spécimen du Havre. Le spécimen MNHN 7267 du Havre possède aussi un prémaxillaire portant 3-4 fortes dents. Il est muni d'une longue branche ascendante, remarquablement développée, qui s'étend en direction postérodorsale jusqu'au bord antérieur du frontal par lequel elle est recouverte.

L'espèce *Lepidotes leedsi* a été définie par Woodward en 1895 à partir des caractéristiques suivantes présentes chez le spécimen type BMNH P 6837 (Woodward, 1895) :

- Espèce, de taille petite ou moyenne, imparfaitement connue
- Os du crâne rugueux avec des tubercules épars
- Os operculaire presque lisse, environ deux fois plus haut que large, et dont la largeur maximale est presque du double de la largeur à sa partie supérieure.
- Le sous-opercule présente un processus antéro-supérieur très large
- Les écailles lisses présentent quelques larges dentelures sur leur moitié inférieure
- Les dents, souvent de forme ovale, sont élevées sur des pédicules et leur sommet est couronné d'un tubercule.

Jain et Robinson, à partir de l'étude du spécimen BMNH P10907, qui est environ 1/3 plus grand que l'espèce-type, décrivent en 1963 les caractéristiques additionnelles suivantes (Jain et Robinson, 1963) :

- Dentition modérément broyeuse
- Suture droite entre les frontaux
- Frontaux allongés avec une partie antérieure longue et très étroite
- Une paire d'extrascapulaires se rejoignant au niveau de la ligne dorsale
- Un nombre réduit de sous-orbitaux et une orbite probablement large

Notre spécimen possède une taille remarquable pour une espèce du Jurassique. Elle est estimée à près de 1m30, d'après la dimension des opercules. Elle présente les caractéristiques morphologiques suivantes similaires à celles de l'espèce *M. lennieri* :

- La forme générale des opercules, deux fois plus haut que large, et avec une largeur maximale qui est presque du double de la largeur à la partie supérieure.
- La forme générale des sous-opercules avec leur branche ascendante large
- La forme générale du prémaxillaire avec sa branche ascendante remarquable qui s'accorde parfaitement avec un frontal dont la partie antérieure serait très étroite.
- Une suture interfrontale droite (caractéristique uniquement de l'espèce du Havre)
- Un maxillaire édenté
- Les processus articulaires et l'ornementation des écailles (lisses avec quelques dentelures sur le bord ventral postérieur)

- Un supracleithrum « crénelé » dans sa partie postéro-dorsale.

Il en diffère néanmoins par les caractéristiques ci-dessous, qui s'accordent plus avec celles présentes chez *fL. leedsi* :

- Les extrascapulaires, au nombre de deux, sont jointifs sur la ligne médiane
- L'ornementation des os du crâne est parsemée de quelques tubercules recouverts de ganoïne
- Une dentition moyennement broyeuse

Si l'on se réfère à la diagnose établie par Schröder (Schröder *et al.*, 2012), notre spécimen ne peut donc pas être rattaché à l'espèce *fM. lennieri* ni au genre *fMacrosemimimus* d'après les trois caractéristiques notées ci-dessus. Les deux premières caractéristiques étant en effet diagnostiques du genre *fMacrosemimimus* et la dernière de l'espèce *lennieri*.

En revanche tous les caractères morphologiques présents chez notre spécimen sont également présents chez les deux spécimens de *fL. leedsi*. Nous serions donc tentés d'attribuer notre spécimen à l'espèce *fL. leedsi*. Mais il faut signaler à ce stade une difficulté majeure liée à l'incomplétude du spécimen type qui rend impossible toute comparaison approfondie. Par ailleurs cette espèce n'a pas encore fait l'objet d'une révision au niveau de sa position systématique au sein des Ginglymodi.

Le positionnement des différents caractères morphologiques de notre spécimen en référence à l'étude cladistique réalisée par Lopez-Arbarello (Lopez-Arbarello, 2012), menée sur la base de 90 caractères distincts, nous conduisent à l'inclure dans l'ordre Semionotiformes, et très probablement dans la famille Callipurbeckiidae, mais peut être aussi au sein du genre *fMacrosemimimus*.

En effet d'après Lopez-Arbarello la condition d'un frontal très allongé et se rétrécissant brusquement pour devenir très étroit et de forme tubulaire sur sa partie antérieure n'est connue pour l'instant en dehors de la famille des Macrosemiidae que dans le genre *fMacrosemimimus*. Notre spécimen n'est clairement pas apparenté aux Macrosemiidae qui possèdent notamment une extension postérieure des pariétaux, et dont les extrascapulaires sont situés en position latérale de ces derniers.

A noter que *fL. leedsi* et *fM. lennieri* présentent également entre eux de nombreuses similitudes morphologiques qui sont bien observables sur les FIGURES 9 et 10, notamment :

- La même forme caractéristique des opercules et des sous-opercules, mais aussi un nombre probablement limité de sous-orbitaux d'après Jain et Robinson (Jain & Robinson, 1963).
- La même forme de frontaux allongés se rétrécissant brutalement sur la partie antérieure et présentant une suture interfrontale droite (cette dernière

caractéristique est présente uniquement sur le spécimen †*M. lennieri* n° MNHN 7267 du Havre)

Mais ces deux espèces diffèrent aussi par les caractéristiques suivantes :

- Dents broyeuses chez *M. lennieri* et plutôt modérément broyeuses chez †*L. leedsi*
- Les os du crâne présentent des tubercules épars recouverts de ganoïne chez †*L. leedsi*
- Les deux extrascapulaires sont jointifs sur la ligne médiane chez †*L. leedsi* mais séparés par une ou deux écailles chez †*M. lennieri*.
- La présence d'une lame sagittale au niveau de la partie antérieure du frontal n'a pas été mentionnée dans le spécimen BMNH P10907 décrit par Jain et Robinson. Cette dernière caractéristique mériterait d'être comparée de visu, il semble exister en effet un renflement longitudinal sur la partie antérieure interne du frontal.

Conclusions

Le spécimen « JRE.2008 » que j'ai découvert en 2008 et dont une partie du matériel a été mise depuis en collection au MNHN sous les références « Coll. EUSTACHE, N° MNHN.F.JRE 548 à 558 », présente de très grandes similitudes avec l'espèce †*Macrosemimimus lennieri*, et plus encore avec l'espèce †*L. leedsi* qui est malheureusement incomplète.

Son genre n'est pas encore déterminé, ou plus exactement sa description de même que celle de †*L. leedsi* ne coïncident avec aucune des diagnoses des nouveaux genres définis récemment dans le cadre de la révision des relations phylogénétiques au sein des Ginglymodii par Lopez-Arbarelo (Lopez-Arbarelo, 2012), après l'éclatement de « l'ancien » groupe †*Lepidotes* qui était polyphylétique (Cavin, 2010).

Je rapporte provisoirement son nom, avec doute, à l'espèce incomplète †*Lepidotes leedsi*. Mais il est probable qu'un changement de nom soit à envisager dans l'avenir notamment quand le positionnement de †*L. leedsi* vis à vis du nouveau genre †*Macrosemimimus* sera clarifié. S'agit-il d'un nouveau genre de la famille des Callipuberckiidae, ou bien d'une espèce à classer au sein du genre †*Macrosemimimus* ? La réponse précise à cette question nécessitera très probablement la découverte et l'étude de spécimens plus complets.

Première partie : Etude histologique des écailles et d'un os dermique

Matériel et méthodes.

Le matériel est constitué de plusieurs lames minces, réalisées au MNHN selon les procédés de fabrication usuels, sur une partie des écailles et des ossements référencée MNHN.F.JRE 548 à 558. Leur épaisseur, d'environ 30 à 80 microns selon les lames, est adaptée à l'observation des détails en microscopie optique. Les lames minces ont également été mises en collection avec pour référence le n° de l'os ou de l'écaille correspondante suivi d'une lettre.

Microscopie optique en transmission.

Les observations de microscopie optique en transmission ont été réalisées selon différentes méthodes pour générer des contrastes variés au sein des images. Nous avons utilisé la microscopie optique en champ clair, la microscopie en lumière polarisée-analysée, et la microscopie optique en contraste interférentiel.

Microscopie en lumière polarisée analysée.

La microscopie optique en lumière polarisée-analysée a d'abord été réalisée de manière classique avec des polariseurs et analyseurs linéaires afin d'étudier les phénomènes de biréfringence et notamment l'orientation des cristaux d'hydroxyapatite. Nous avons également réalisé quelques essais exploratoires avec des polariseurs et analyseurs circulaires. Ils ont donné des résultats très intéressants et prometteurs. L'intérêt d'utiliser un système de polariseurs et analyseurs circulaires en lieu et place d'un système de polariseurs et analyseurs linéaires est que toutes les orientations des cristaux d'hydroxyapatites présentes dans le plan de la coupe sont également allumées (alors que celles perpendiculaires au plan de coupe sont éteintes), sans le phénomène d'extinction des cristaux d'hydroxyapatite ou du collagène dont les orientations sont parallèles aux axes des polariseurs et analyseurs linéaires. En conséquence il est beaucoup plus facile d'étudier les phénomènes de biréfringence sur l'ensemble de la coupe, indépendamment de son orientation relative vis-à-vis des axes des polariseurs et analyseurs linéaires. Cette technique, encore peu employée, a été utilisée avec succès pour quantifier l'orientation du collagène dans des ostéones sur des os actuels (Bromage *et al.*, 2003).

Microscopie à contraste interférentiel.

Enfin nous avons exploité les avantages de la microscopie à contraste interférentiel, connue sous l'acronyme D.I.C (Differential Interference Contrast). Elle permet de réaliser des coupes optiques extrêmement fines au sein d'échantillons épais (de l'ordre de 0,5 microns pour un objectif X100) et donc de révéler des détails habituellement inobservables avec les autres méthodes (Murphy *et al.* dans <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/dic/dicintro.html>). Elle donne sur des objets transparents des images proches de celles obtenues en contraste de phase.

Elle est également sensible à la biréfringence des échantillons car elle utilise un polariseur et un analyseur linéaire situés à l'entrée et à la sortie d'un système optique constitué de prismes de Wollaston (Murphy *et al.* dans <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/dic/dicintro.html>).

Microscopie électronique à balayage

Les observations de microscopie électronique à balayage ont été réalisées sur le microscope environnemental « TESCAN VAGAII LSU » du MNHN en mode électrons secondaires, avec une tension d'accélération de 15Kv, après métallisation de la surface avec une couche d'or ou de carbone de 20 nm d'épaisseur ; et également sur un microscope Quanta 250 de la société FEI équipé d'un canon à effet de champ (FEG-SEM) qui permet de s'affranchir de l'étape de métallisation des échantillons. Les analyses qualitatives élémentaires ont été réalisées grâce à l'analyse de l'émission des rayons X, suite au bombardement de la surface par les électrons incidents, avec un détecteur EDS (Perrin dans http://www.cmeha.univ-rennes1.fr/Principe_MEB.html).

Rappels historiques (histologie)

Conservation des structures & processus diagénétiques.

Les structures histologiques d'écailles et d'ossements fossiles datant de plusieurs millions d'années ressemblent souvent à s'y méprendre à celles observées sur des matériaux actuels, lors des observations de microscopie optique (Ørvig, 1966).

Cela peut paraître surprenant sachant que les nombreux processus taphonomiques et diagénétiques à l'œuvre une fois l'animal mort conduisent généralement à une destruction rapide des structures organiques et à la modification des structures minérales présentes dans les échantillons fossilisés. Lors de conditions environnementales particulières favorisant les préservations exceptionnelles, tissus mous et structures cellulaires peuvent néanmoins être partiellement conservés (Schweitzer *et al.*, 2007). Les fibres de collagène et l'hydroxyapatite, qui sont les constituants majeurs des écailles et des ossements, peuvent rester non altérés sur des durées considérables, notamment quand ces deux composants étroitement associés forment un système fermé n'interagissant pas ou peu avec l'environnement. Bien souvent les constituants organiques macromoléculaires des cellules et de la matrice extracellulaire sont dégradés *post-mortem* en des chaînes plus courtes constituées par exemple des acides aminés constitutifs dans le cas du collagène ou d'autres produits dérivés qui, bien que stables chimiquement sur des durées fort longues, peuvent être extraits des tissus durs environnants par un phénomène de percolation des eaux interstitielles provenant du milieu extérieur. De même selon un processus similaire les espaces laissés libres peuvent être comblés ultérieurement soit par de la matière organique, comme l'acide humique provenant du milieu de fossilisation, ou bien par des sels minéraux qui vont cristalliser ensuite au sein des cavités. A l'inverse des processus de dégradation conduisant à des scissions de chaînes, ceux conduisant à une

réticulation des chaînes macromoléculaires entre elles vont empêcher les phénomènes d'extraction par les eaux interstitielles et favoriser la conservation d'une matière organique endogène, certes chimiquement dégradée, au sein de l'échantillon. Sans nécessairement faire référence à des attaques fongiques ou microbiennes qui sont aussi à l'œuvre, la matière organique, si elle est présente dans une écaille fossile peut donc avoir une origine endogène ou bien une origine exogène suite aux nombreux processus biologiques et physico-chimiques qui se sont succédés.

De même l'hydroxyapatite qui est le constituant minéral principal de l'émail, de la dentine et de l'os des écailles ganoïdes ne persiste pas indéfiniment. Selon les conditions de pH du milieu il peut être dissout, ce qui conduit à la destruction totale ou partielle du fossile ou bien de sa structure interne, mais aussi graduellement se transformer en une structure chimique plus stable, comme la fluoroapatite (Francillon-Vieillot, et al., 1990). Dans ce dernier cas, fréquemment observé, cette modification se produit en conservant les structures internes microscopiques du fossile mais également l'orientation originale des cristallites eux-mêmes.

Ces processus complexes peuvent conduire à des niveaux de préservation variés non seulement entre différents spécimens mais également, au sein d'un même échantillon, entre différentes zones séparées parfois d'une fraction de millimètre. Meilleure est la finesse de préservation des structures histologiques au niveau microscopique et plus grande est la probabilité de trouver des fragments organiques endogènes au sein de l'échantillon, indépendamment de l'âge absolu du fossile (Schweitzer *et al.*, 2008).

Les processus diagénétiques qui conduisent à préserver la texture interne du fossile et l'orientation originelle des cristallites d'hydroxyapatite permettent d'expliquer l'intérêt des observations paléohistologiques. Néanmoins même si les structures histologiques observées en microscopie optique par différentes techniques (transmission, lumière polarisée analysée, contraste de phase ou contraste interférentiel), sur les matériaux fossiles ou actuels paraissent semblables, l'origine du contraste des images qui dépend aussi de la technique utilisée est souvent de nature différente. Ces différences de contraste à l'origine des images sont à garder en mémoire pour une interprétation correcte des observations de lames minces d'écailles fossiles en microscopie optique.

Principaux caractères histologiques descriptifs des écailles ganoïdes

Les auteurs s'accordent à classer la structure histologique des écailles ganoïdes actuelles et fossiles en deux types principaux : les écailles de type paléoniscoïde et les écailles de type lépidostéoïde (Goodrich, 1907 ; Kerr, 1952 ; Gayet et Meunier, 1993 ; Schultze, 1996).

Le premier type regroupe les écailles des paléonisciformes. Il est caractérisé par la présence d'une couche importante de dentine, intercalée entre la ganoïne et l'os basal. Cette dentine est associée à un réseau de canaux et de cavités vasculaires. On trouve de plus chez les Polypteridae fossiles et actuels, dont la structure histologique des écailles

est très proche de celle de type paléoniscoïde, une structure lamellaire supplémentaire dite en contreplaqué, située au niveau de l'*initium*, qui correspond à de l'élasmodine (Sire, 1989 ; Gayet et Meunier, 1992 ; Sire *et al.*, 2009).

Les écailles de type lépidostéoïde, présentes chez les Holostéens, et en particulier chez les genres actuels *Lepisosteus* et *Atractosteus*, ne possèdent pas de dentine, ni de réseau marqué de canaux et de cavités vasculaires. L'os basal lamellaire ou pseudo-lamellaire de ces écailles est parcouru par un système de canaux caractéristiques perpendiculaires aux lignes d'accroissement, les *canaliculi* de Williamson, dont la fonction et l'origine restent encore discutées (Sire et Meunier, 1994).

Il est intéressant de signaler qu'une présence discrète et localisée de dentine a déjà été décrite chez quelques taxons lépisostéiformes et sémionotiformes. Brito et collaborateurs (Brito *et al.*, 2000) ont observé, au sein des lépisostéiformes, sa présence chez †*Obaichthys decoratus* et chez †*Dentilepisosteus laevis* du Crétacé inférieur du Brésil. Ces auteurs considèrent la présence de dentine entre la ganoïne pluristratifiée et la plaque basale osseuse comme une condition plésiomorphe chez les actinoptérygiens. Ils font l'hypothèse que la transition entre une écaille de type paléoniscoïde et une écaille de type lépidostéoïde a probablement été graduelle. Ils en déduisent la position plésiomorphe du genre †*Obaichthys* au sein de la famille Lepisosteidae. †*Obaichthys africanus*, du Cénomanién saharien, dont la surface des écailles présente des crêtes longitudinales caractéristiques, possède également des zones de dentine développées autour de canaux vasculaires et sous les crêtes constituées de strates de ganoïne (Meunier *et al.*, 2016).

Chez les sémionotiformes, par exemple les †*Lepidotes mantelli* (Brito *et al.*, 2000) mais également les †*Lepidotes minor*, †*Lepidotes latifrons*, et au sein des genres †*Semionotus* et †*Dapedius* (Schultze, 1996), les deux types paléoniscoïde et lépidostéoïde peuvent également coexister.

La position systématique basale du spécimen « JRE.2008 » en fait un candidat intéressant pour appréhender sa structure histologique, et notamment l'étude de la présence de dentine, en lien avec ses relations phylogénétiques.

Mécanisme de formation d'un odontode selon Ørvig.

L'organisation structurale de la dentine au sein des écailles présente de nombreuses similitudes avec celle des odontodes, ces ornements que l'on observe sur les os dermiques. Je rappelle ici quelques données générales relatives à leur morphogénèse.

Le premier stade de développement d'un odontode est la condensation de cellules du mésenchyme pour former une papille dentaire qui se développe à proximité de la couche basale de l'épiderme. Les cellules mésenchymateuses acquièrent ensuite une compétence odontogénique (Sire *et al.*, 2009). Au stade suivant et de manière schématique, les cellules épithéliales qui recouvrent la papille dermique vont se

différencier en améloblastes et déposer de manière polarisée en direction de cette dernière la matrice organique de l'émail. Les cellules mesenchymateuses sous-jacentes aux cellules épithéliales vont quant à elles se différencier en odontoblastes et déposer la matrice organique de la dentine.

Ørvig a défini le concept d'odontocomplexe et son mode de formation par croissance latérale d'odontodes juxtaposés (Ørvig, 1977). Chaque odontode prend son origine dans une papille dentaire bien différenciée. Cette dernière incorpore des vaisseaux vasculaires et on y observe la présence de lignes de résorption sur un de ses bords. D'après cet auteur, la résorption du tissu osseux a lieu en même temps que le dépôt de la matrice organique de la dentine par les odontoblastes sur le bord opposé. Les lignes de résorption présentent une forme caractéristique en creux, on les appelle des lacunes de Howship. Elles sont dues à une famille de cellules particulières, les ostéoclastes.

Les canaliculi de Williamson : caractéristiques principales et repères historiques.

Je développe particulièrement cette partie car je propose dans ce mémoire une hypothèse nouvelle concernant la nature et la fonction des entités connues sous le nom de « canaux vasculaires de Williamson ». Il me paraît à cet égard important de faire un point précis des travaux antérieurs.

La présence de nombreux tubules au sein d'écailles ganoïdes avait déjà été mentionnée par Agassiz (Agassiz, 1833-1843), mais nous devons à Williamson une description très précise et toujours d'actualité de leur structure histologique et de leur organisation chez *Lepisosteus osseus*, et chez des espèces fossiles, notamment *Lepidotes semiserratus* (Williamson, 1849).

Les *canaliculi* de Williamson correspondent aux longs tubules d'un diamètre régulier d'environ 3 microns, que Williamson a décrit en 1849, et qui traversent la partie osseuse de certaines écailles ganoïdes des bords internes jusqu'au centre en suivant un cheminement quasi perpendiculaire à celui des lamelles osseuses. Leur extrémité se compose d'un plumet caractéristique fait de deux ou trois courts prolongements cytoplasmiques. Ils peuvent parfois se diviser ou traverser la ganoïne, mais le plumet se situe toujours sous cette dernière (Williamson, 1849 ; Sire et al., 1994). Par ailleurs ils sont présents dans les écailles mais aussi au sein des os dermiques et de l'endosquelette (Sire et Meunier, 1994).

Depuis les premières descriptions de Williamson ces tubules ont été nommés de différentes manières : tubules avec des extrémités ramifiées (Goodrich, 1907), tubules lépidostéoïdes (Kerr, 1952), canaux de Williamson (Tretjakoff, 1930 dans (Sire et Meunier, 1994)), canaux non vasculaires de Williamson, canaux vasculaires de Williamson (Ørvig, 1951 ; Schultze, 1966), *canaliculi* de Williamson (Sire et Meunier, 1994).

Ils seraient un caractère diagnostique du groupe des Holostéens (Meunier F., 2011) bien que ce caractère soit encore peu exploité dans les études phylogénétiques (Grande, 2010).

Si la nature et la fonction des *canaliculi* et la nature du tissu dans lequel ils sont présents ont donné lieu par le passé à de nombreuses controverses (Sire et Meunier, 1994), aujourd'hui un consensus existe concernant ceux présents chez les représentants actuels, *Lepisosteus*, *Atractosteus* et *Amia*.

Les *canaliculi* de Williamson sont en effet considérés comme des éléments caractéristiques de la substance osseuse. Ils sont issus de cellules particulières, les cellules de Williamson (Thomson & McCune, 1984b). Elles ont un comportement migratoire analogue à celui des odontoblastes. Leur étude ultra-sculpturale a révélé qu'elles joueraient probablement un rôle trophique similaire à celui de vaisseaux capillaires, en synthétisant des nutriments (amino-acides, sucres, sels minéraux) qu'elles transporteraient vers les parties profondes de l'écaille grâce aux longs prolongements cytoplasmiques situés au sein des *canaliculi* (Sire et Meunier, 1994). Les écailles de type lépidostéoïde ne sont en effet que peu vascularisées contrairement aux écailles de type paléoniscoïde (Goodrich, 1907).

La situation n'est pour l'instant pas encore totalement clarifiée en ce qui concerne la nature des *canaliculi* de Williamson observés chez les espèces fossiles, notamment celles présentant de la dentine.

Il me semble important de rappeler ici les différentes observations et hypothèses qui ont été formulées à ce sujet notamment par Williamson, Goodrich, Ørvig, Schultze, Thomson et McCune, Sire et Meunier.

Dans sa description des écailles de *Lepidotes semiserratus*, Williamson observe l'existence de nombreux tubules parallèles d'un diamètre moyen très légèrement supérieur à ceux présents chez *Lepisosteus osseus* (4,5 microns vs. 3,2 microns) mais dont la structure et la disposition au sein des écailles sont similaires (Williamson, 1849). Il note que les tubules se terminent soit d'une manière analogue à celle observée chez *Lepisosteus osseus*, soit sous la forme d'un faisceau étendu de ramifications au sein d'une très fine couche située au niveau des dentelures marquant la jonction avec la ganoïne. Ces ramifications « rappelant les branches sans feuille d'un arbre en hiver » possèdent la particularité de communiquer entre elles au moyen de boucles. Elles sont anastomosées. Il constate que la fine couche où se terminent ces ramifications est de nature différente de celle de la ganoïne et de l'os sous-jacent et lui donne le nom de « kosmine » (i.e. dentine). Cette couche, en effet contrairement à l'os, ne contient pas de lacune ostéocytaire mais de nombreux canalicules très fins et ramifiés. Il remarque enfin que les extrémités des tubules issus des deux bords libres de l'écaille (i.e. les deux bords recouvrant les écailles adjacentes) se terminent dans la couche de « kosmine »

tandis que ceux provenant des deux bords opposés se terminent de la manière ordinaire dans la partie osseuse basale.

Goodrich, dans sa description des écailles de type lépidostéoïde observe comme Williamson que parfois, notamment chez *†Lepidotes*, les tubules peuvent se terminer en de fines branches au niveau des dentelures caractéristiques de l'interface avec la ganoïne (Goodrich, 1907). Contrairement à Williamson, il ne considère pas cette région comme étant de la « kosmine » (ie. dentine) car elle ne contient ni cavité pulpaire, ni réseau vasculaire. D'après lui elle n'est donc pas homologue à la « kosmine » (ie. dentine) des paléoniscides.

Ørvig distingue les deux types de tubules décrits précédemment selon qu'ils se terminent dans la dentine ou l'os et les nomme respectivement canaux vasculaires de Williamson et canaux non vasculaires de Williamson (Ørvig, 1951). Sa définition des canaux non vasculaires de Williamson s'accorde bien avec celle admise pour les *canaliculi* de Williamson des espèces actuelles, qui sont issus de cellules de Williamson (Sire et Meunier, 1994). Mais sa définition des canaux vasculaires de Williamson possède une signification différente. Ørvig nomme en effet canal vasculaire de Williamson tout canal vasculaire ascendant en connexion avec la dentine indépendamment de son diamètre. Je le cite:

« *Those of the canals in question which carried vessels, or capillaries, and from whose terminal ends dentinal tubes pass off, may be distinguished as canals of WILLIAMSON sensu stricto, or vascular canals of WILLIAMSON, whereas the others, which are under reduction so that their vessels have disappeared and so that they do not connect terminally with dentinal tubes, will be termed non-vascular canals of WILLIAMSON.* »

Ørvig dénomme sous le terme de « canaux vasculaires de Williamson » non seulement les fins tubules de 3 à 5 microns de diamètre se terminant dans la dentine que l'on peut observer chez *†Lepidotes* et d'autres Holostéens, mais aussi des canaux vasculaires ascendants bien plus larges présents chez les paléonisciformes, par exemple les larges canaux vasculaires bordés d'ostéocytes polarisés des écailles de *†Scanilepis dubia* (Ørvig, 1978a). Ce faisant d'une part il distingue des structures histologiques que Williamson et Goodrich considéraient similaires, et leur attribue des natures différentes, et d'autre part il regroupe sous une même dénomination des structures histologiques probablement fort éloignées !

Les définitions d'Ørvig s'appuient sur deux hypothèses. Il suppose l'existence d'une évolution phylogénétique graduelle de la structure entre les écailles de type paléoniscoïde et celles de type lépidostéoïde. Il fait aussi et surtout référence à la théorie des unités lépidomorales qu'il a développé avec Stensio, afin d'expliquer la nature de ces canaux (Ørvig, 1951).

Selon cette théorie (Donoghue, 2002) les systèmes squelettiques dermique et dentaire sont issus de modules de développement élémentaires appelés *lepidomoria*. Chaque *lepidomorium* se compose d'une couronne de dentine parfois recouverte d'émail, assise sur une plaque basale. Il se développe à partir d'une papille dermique alimentée par une petite boucle vasculaire. La circulation sanguine irrigue la papille en entrant par un capillaire ascendant provenant d'un complexe vasculaire sous-jacent situé au sein du *corium* et ressort par un canal latéral situé près du collet.

D'après Ørvig les canaux vasculaires et non vasculaires ascendants de Williamson dériveraient du capillaire vasculaire ascendant de l'unité lépidomoriale tandis que les canaux de Williamson entrant par la face externe des écailles en passant à travers la ganoïne dériveraient du canal latéral du *lepidomorium* (Ørvig, 1951). Les canaux en forme d'arche décrits par Williamson et reliant les tubules au niveau de la dentine sont également assimilés par Ørvig aux canaux latéraux des unités lépidomoriales. Le système comprenant un canal de Williamson ascendant avec ses extrémités ramifiées dans la dentine et connecté à ses voisins par un canal latéral constituerait en soi une unité lépidomoriale. Je le cite à nouveau:

« In these forms the dentine layer throughout its extent consists of small lepidomorial dentine units or crowns which, just as in scales of several Subholostean and holostean Ganoids, are represented by **tufts of dentinal tubes which issue from the superficial parts of vascular canals ascending from below towards the dentine. These ascending vascular canals, which are clearly the basal canals of Williamson belonging to the lepidomorial units** in question, are connected superficially by a network of narrow, arch-like canals, representing, at least in part, the neck-canals of Williamson of thoses units (Ørvig, 1956) ».

Ørvig a introduit dans ses publications une nomenclature multiple pour décrire les canaux de Williamson. Elle engendre plus de confusion qu'elle n'apporte de précision. J'ai répertorié ses nombreuses définitions dans le TABLEAU 2.

Toutes ces variantes n'ont que peu d'utilité, can.W' par exemple n'apporte aucune information histologique, un canal vasculaire de Williamson d'après la définition même d'Ørvig se terminant dans la dentine. Il pourrait s'agir soit d'un artéfact d'observation lié à l'épaisseur fine de la coupe qui ne permet pas de suivre le canal sur toute sa longueur, où bien d'un phénomène de résorption lié à une activité ostéoclastique à cet endroit. De même il n'est pas nécessaire de distinguer les canaux de Williamson descendants. Williamson avait en effet observé que la direction des « tubules » est toujours perpendiculaire aux lamelles et que ces dernières se replient parfois sur les marges, ce repliement conduit donc à des canaux horizontaux voire à des canaux descendants.

Les canaux vasculaires de Williamson ont également été décrit par Schultze (Schultze, 1966) dans des écailles du sémionotiforme *Histionotus angularis*, en association avec

des canaux non vasculaires de Williamson. Les structures qu'il observe sont très proches de celles que j'observe sur le spécimen JRE.2008. J'en donne une illustration dans la FIGURE 11.

Thomson et McCune ont aussi étudié l'arrangement des canaux de Williamson au sein d'un sémionotiforme fossile (Thomson & McCune, 1984b). Ils restreignent l'usage du terme « canal de Williamson » aux canaux qui, comme ceux des lépisostées actuels, sont issus de cellules de Williamson et ne sont pas en connexion avec d'autres systèmes de canaux. Ils observent une fine couche de dentine localisée au niveau de l'interface avec la ganoïne. Cette dernière ne présente ni cavité pulpaire, ni vascularisation, mais chacune des arborescences constituées par des tubules de dentine apparaît connectée à un canal se dirigeant vers les marges latérales de l'écaille. Ils décrivent ce canal comme étant d'apparence similaire à un canal de Williamson, à l'exception des tubules de dentine terminaux, et ils le nomment « canal de la dentine ».

Sire et Meunier introduisent le terme « *canaliculi* de Williamson » pour éviter toute confusion entre les canaux de Williamson, dont le diamètre varie de 3 à 5 microns, et des canaux vasculaires qui sont généralement plus larges ou des tubules de dentine plus étroits (de 1 à 2 microns) (Sire et Meunier, 1994). Dans leur étude d'écailles régénérées ils observent que des cellules de Williamson sont parfois présentes avec des ostéoblastes au sein des parois de canaux vasculaires. Ils supposent qu'au cours de l'évolution, des cellules apparentées aux ostéoblastes et situées au sein de cavités vasculaires ont développé une fonction nutritive probablement en lien avec la disparition du réseau de canaux vasculaires et la réduction de la couche de dentine. Dans ce cas les *canaliculi* de Williamson apparaissent secondairement acquis et représenteraient une spécialisation.

En résumé les auteurs s'accordent sur la nature et la fonction des *canaliculi* de Williamson présents chez les Holostéens tant qu'ils ne sont pas en connexion avec la dentine.

Dans les cas où ils sont en connexion avec cette dernière, notamment chez certains Holostéens fossiles, alors les hypothèses divergent. J'ai synthétisé dans le TABLEAU 3 les principales hypothèses qui ont été faites à ce sujet.

Je propose de nommer provisoirement dans ce mémoire « *canaliculi* de Williamson de type II» , les canalicules d'un diamètre moyen de 3 à 5 microns en tout point similaires aux *canaliculi* de Williamson à l'exception de leur extrémité se terminant non pas dans de l'os mais dans de la dentine sous la forme d'un faisceau de fines ramifications.

J'introduis ce terme afin de pouvoir les distinguer des canaux vasculaires plus larges (diamètre > 8 microns) avec lesquels ils ont été parfois assimilés suite à la définition d'Ørvig. Cette nouvelle désignation fait référence à leur petit diamètre et à la localisation particulière de leurs extrémités vis-à-vis des *canaliculi* de Williamson

classiques. Elle ne suit pas l'appellation historique faite par Ørvig de « canaux vasculaires de Williamson » qui est une source de confusion. A ce stade de notre discussion cette dénomination ne préjuge pas encore de leur nature :

S'agit-il de véritables capillaires ascendants issus des unités lépidomoriales, ou bien d'une forme particulière de tubules de la dentine, ou tout simplement de *canaliculi* de Williamson classiques issus de cellules de Williamson ? Ce questionnement sera l'objet de notre discussion.

Matrice extracellulaire du tissu osseux.

La matrice organique extracellulaire du tissu osseux est constituée majoritairement de fibres de collagène mais aussi de diverses molécules complexes dont les protéoglycanes (Meunier et François, 1992). Elle est générée par des cellules, les ostéoblastes, situées en périphérie du tissu osseux. Les fibres de collagène peuvent s'organiser en strates successives où elles sont toutes parallèles entre elles. Si d'une strate à l'autre, les fibres conservent une même orientation, on parle de tissu osseux à fibres parallèles ou de tissu osseux pseudo-lamellaire. Dans le cas où l'orientation de l'ensemble des fibres change d'une strate à l'autre, on parle de tissu osseux lamellaire. La substance pré-osseuse se minéralise grâce au dépôt de microcristaux d'hydroxyapatite, sur, en et à l'entour des fibres de collagène. Quand les microcristaux d'hydroxyapatite se déposent entre les fibrilles de collagène et conservent l'orientation de ces dernières, on parle de cristallisation ou de calcification inotropique (Ørvig, 1966). Les ostéoblastes lorsqu'ils sont incorporés dans la matrice organique minéralisée, devenue la substance osseuse, s'appellent ostéocytes. Ils sont enchâssés dans une logette d'où partent des *canaliculi* qui abritent de fins prolongements cytoplasmiques. La forme générale des ostéocytes dépend du type de cellule mais aussi de la texture osseuse environnante.

La texture de la matrice organique donne une indication sur la vitesse de l'ostéogénèse associée au métabolisme général (Meunier *et al.*, 2008). Le taux moyen de minéral sous forme d'hydroxyapatite dans l'os est d'environ 65% du poids sec, mais il peut varier de plus ou moins 20% selon les régions considérées.

Marques de croissance et âge des spécimens.

La vitesse de croissance des écailles est modulée tout au long de la vie du poisson par des facteurs internes et externes. Parmi les facteurs internes on peut citer les différentes étapes de la vie du poisson : stade juvénile, adulte ou âgé et les périodes de frai. Au niveau des facteurs externes, notons l'importance de la saisonnalité sur la croissance avec des périodes dites « d'hivers physiologiques » où la nourriture se fait plus rare et les conditions de vie plus difficiles. Ces « hivers » qui peuvent être plus ou moins rigoureux selon les années, ne correspondent pas nécessairement à des fluctuations de la température externe, mais peuvent correspondre aussi à l'alternance de périodes sèches et humides en zone tropicale. Leur fréquence n'est pas nécessairement annuelle. Enfin l'impact de phénomènes ponctuels et contingents, par

exemples ceux liés à des agressions diverses ou des maladies peuvent également conduire à des modifications du rythme de croissance des écailles du spécimen considéré.

Ces phénomènes se traduisent par la présence de marques de croissance sur les écailles : zones, annuli, L.A.C (lignes d'arrêt de croissance) sont liés à des modifications de la composition chimique de la substance osseuse lors de la croissance (taux de minéralisation, proportions des composants organiques de la matrice extracellulaire) et constituent une véritable « boîte noire » de l'histoire de la vie du poisson (Meunier, 2002).

Thomson a tenté de déterminer le premier l'âge de poissons fossiles. Il s'agit de spécimens de †*Semionotus*, poissons du mésozoïque proches du spécimen « JRE.2008 » au plan phylogénétique, mais inféodés aux lacs d'eau douce. Cette détermination a été réalisée à partir du comptage des incréments de dentelures à l'interface os-ganoïne associée à l'étude de marques caractéristiques observées sur les lames minces des écailles.

L'auteur observe dans son article de référence (Thomson & McCune, 1984a) des zones caractéristiques de couleur noire, suivant les lignes de croissance d'écailles, qu'il attribue aux *annuli*. L'étude par radiographie X de ces zones montre une augmentation relative du pourcentage de matière organique vis à vis de la proportion de phase minérale. Il interprète ces marques comme étant dues à des ralentissements de la croissance des écailles et les utilise pour estimer l'âge approximatif des spécimens à disposition.

Son interprétation me semble néanmoins en décalage avec ce qui est connu des phénomènes de croissance des poissons actuels. Il suppose en effet que lors des ralentissements de croissance le taux de matière organique dans la substance osseuse est plus important que lors des périodes de croissance rapides, alors que de nombreuses études montrent le contraire. Les *annuli* et les lignes d'arrêt de croissance (L.A.C.) sont en effet, sauf quelque rares exceptions (Castanet, 1979), des régions légèrement hyperminéralisées vis-à-vis des zones adjacentes à croissance plus rapide (Castanet, 1979 ; Castanet, 1981 ; Castanet *et al.*, 1977 ; Meunier, 1980 ; Meunier, 2002).

Ces interprétations divergentes nous montrent la difficulté à faire concilier parfois des observations entre écailles fossiles et écailles actuelles, probablement à cause des phénomènes complexes liés aux transformations chimiques durant la fossilisation qui modifient la nature du contraste des images.

Biréfringence des fibres de Sharpey chez quelques spécimens fossiles.

Je présente ici dans le détail un phénomène particulier décrit par Ørvig concernant l'organisation des fibres de Sharpey dans les écailles d'un Elasmobranch et

l'interprétation qu'il en donne, car j'ai observé un phénomène semblable sur les écailles du spécimen JRE.2008.

Ørvig observe sur des écailles d'*Holmesella* ? sp. (Ørvig, 1966), une structuration périodique des fibres extrinsèques, dites fibres de Sharpey, qui relient les écailles entre elles et au derme sous-jacent (Kerr, 1952). En lumière polarisée-analysée il observe en effet des zones où les fibres apparaissent brillantes qui alternent avec d'autres zones plus sombres (cf. plate 4 dans (Ørvig, 1966)). Dans ces dernières, les fibres extrinsèques sont peu visibles voire totalement masquées par les fibres intrinsèques qui leur sont perpendiculaires. D'après lui cette structuration correspondrait à une minéralisation périodique des fibres de Sharpey. Elle interviendrait probablement lors de périodes d'arrêt ou de ralentissement de la croissance de l'écaille et pourrait servir peut-être à renforcer l'ancrage des écailles avec le tissu conjonctif sous-jacent.

L'interprétation qu'il donne de ces structures fossilisées me semble intéressante. J'en rappelle ici les grandes lignes. Selon lui le principal composant organique de l'écaille, le collagène, a disparu au cours des processus de fossilisation et n'est plus présent dans le tissu osseux. De même le composant minéral, l'hydroxyapatite a subi une transformation chimique en une structure plus stable, la fluoroapatite. Mais cette transformation s'est réalisée en préservant l'orientation originelle des cristaux d'hydroxyapatite. Sur une écaille actuelle, les fibres extrinsèques présentent une biréfringence positive due au collagène, alors qu'elles ont une biréfringence négative sur un matériel fossile. Ce signe négatif traduirait la biréfringence des cristaux de fluoroapatite. Leur disposition refléterait l'orientation originelle des fibres extrinsèques de collagène et des cristaux d'hydroxyapatite qui leur étaient intimement associés et qui ont minéralisés selon un processus inotropique du vivant de l'animal.

Etude histologique des écailles du sémionotiforme JRE.2008.

Description générale de la structure histologique des écailles.

Observation des lames minces en microscopie photonique.

La structure générale des écailles référencées JRE549 (lames minces JRE.549 d et e) et JRE 550 (lame mince JRE.550 c et d) est constituée localement de deux ou de trois couches superposées : une couche de ganoïne pluristratifiée recouvre, ou non, un niveau discret de dentine, situé au-dessus d'une partie basale formée d'os cellulaire faiblement vascularisé et pseudo-lamellaire. A certains endroits, la couche d'os pseudo-lamellaire est directement recouverte par la ganoïne (FIGURE 12). A d'autres endroits, notamment à proximité de *l'initium* et dans la région ventro-postérieure de l'écaille, s'intercale entre les couches d'os basal et de ganoïne une fine strate de dentine (FIGURE 13). Cette dentine qui s'étend en surface de l'écaille, est beaucoup moins développée en épaisseur que celle présente dans les écailles des polyptères actuels ou dans les écailles des paléonisciformes. Elle est localement subdivisée en de nombreuses

petites unités. Chaque unité de dentine apparaît associée à une strate de ganoïne. Elle est séparée de l'unité de dentine adjacente par une ligne de résorption (FIGURE 14). On peut observer dans certaines des unités de dentine la présence fugace ou la signature d'une petite aire vascularisée, ultérieurement comblée, d'où partent de fins canalicules odontoblastiques (FIGURE 13 et 14).

La plaque basale osseuse est très faiblement vascularisée. Elle est traversée par de nombreux *canaliculi* de Williamson dont les diamètres varient entre 3,0 et 5,5 microns. Ces *canaliculi* sont orientés en direction des faces internes et latérales de l'écaille selon un cheminement presque en ligne droite (FIGURE 15). Ils traversent les nombreuses strates d'os pseudo-lamellaire quasi perpendiculairement à ces dernières. Leurs origines se situent au sein de l'os pseudo-lamellaire. Au niveau de l'*initium*, les *canaliculi* sont orientés uniquement vers la partie profonde de l'écaille avec leurs terminaisons pointant vers sa face supérieure. Ces dernières sont faites d'un plumet caractéristique, constitué de courtes ramifications cytoplasmiques en éventail, étalées préférentiellement selon la direction des fibres de collagène de la matrice osseuse. Quelques rares *canaliculi*, après avoir suivi le bord latéral de l'écaille, traversent ensuite les strates de ganoïne en direction de la surface externe de l'écaille.

D'autres *canaliculi* d'apparence semblable aux premiers, et dont le diamètre varie également entre 3,0 et 5,5 microns, sont orientés vers les régions latérales de l'écaille. **Ils prennent naissance au sein de la couche de dentine située à l'interface avec la ganoïne** (FIGURE 16). Leurs terminaisons se présentent non pas sous la forme du plumet caractéristique des *canaliculi* de Williamson, mais sous la forme d'un faisceau plus étendu constitué de fins et longs prolongements cytoplasmiques. Ces terminaisons semblent à première vue proches morphologiquement des processus odontoblastiques de la dentine (FIGURE 17). Ces *canaliculi* particuliers, courant le long du bord latéral, sont généralement branchés, avec plusieurs extrémités situées parfois dans des unités successives de dentine (FIGURE 16 et 19). Comme je l'ai précisé dans la partie bibliographique je me propose de les appeler *canaliculi* de Williamson de type II pour pouvoir mieux les distinguer par la suite.

La plaque basale est cellulaire et faite d'os pseudo-lamellaire : sa trame est constituée de fibres parallèles relativement épaisses. Elle incorpore de nombreux ostéocytes, de forme étoilée, plus ou moins aplatis et alignés dans le sens des fibres. Les dimensions des logettes ostéocytaires sont d'environ 8 à 12 microns sur leur plus grand diamètre. Les prolongements cytoplasmiques des ostéocytes sont souvent connectés entre eux. Ils forment un réseau à l'intérieur de chaque lamelle osseuse (FIGURE 20).

La plaque basale est enfin traversée localement par des faisceaux de fibres extrinsèques, les fibres de Sharpey, reliant les écailles entre elles et au derme sous-jacent (FIGURE 21).

Observations en Microscopie électronique à Balayage.

Ces observations au microscope électronique à balayage (M.E.B) de la surface des sections d'écaillés (JRE.549b) après leur polissage et une attaque légère à l'acide chlorhydrique dilué à 10%, apportent des informations complémentaires de celles des lames minces. Elles fournissent une résolution améliorée, mais aussi une information additionnelle qualitative sur la composition chimique élémentaire des structures, grâce à l'apport de la micro-sonde à rayons X intégrée au microscope.

La FIGURE 22 présente une image de la surface de ganoïne multi stratifiée et de la lame basale osseuse observées à faible grossissement. Les *canaliculi* de Williamson ainsi que les canaux vasculaires ressortent en positif. Leur cheminement sur la plaque basale est différent. Il est possible d'estimer leurs diamètres respectifs. Ceux des *canaliculi* de Williamson sont d'environ 3 microns, en accord avec les mesures de microscopie optique, tandis que les diamètres des canaux vasculaires sont légèrement plus larges et sont d'environ 5 à 6 microns. Les écarts de diamètre entre ces deux canaux restent faibles, et il serait possible de les confondre d'après ce seul critère. Mais la texture des canaux vasculaires apparaît légèrement torsadée sur les images. Leur cheminement est plus tortueux et leur disposition au sein de l'écaille s'écarte de celle des *canaliculi* de Williamson. Ces différents éléments combinés permettent de les discriminer.

Une analyse de la composition chimique de ces deux types de canaux par micro-sonde X (FIGURES 23 et 24), révèle la présence majoritaire de carbone, ce qui explique pourquoi ces structures ont été moins attaquées par l'acide, contrairement à la matrice osseuse minérale. Ils apparaissent donc en relief à sa surface.

L'analyse X de cette dernière (FIGURE 25 et 27) révèle la présence des éléments suivants : P et Ca, sont majoritaires, puis viennent le F et le C. L'élément O est ubiquiste, le Cl pourrait venir du traitement utilisé. Cette composition élémentaire est bien cohérente avec la nature chimique de la substance osseuse, où le composant minéral majoritaire, l'hydroxyapatite, peut être transformé en fluoroapatite lors de la diagénèse.

La comparaison avec la composition élémentaire de la ganoïne est intéressante, Figure 26) : On y trouve également du P et du Ca mais peu de F ni de C. Cette observation est aussi cohérente avec la structure très minéralisée de la ganoïne (95%) vis-à-vis de la substance osseuse originelle qui contient avant sa fossilisation de 30 à 40% de matière organique. Par ailleurs l'absence de fluor montre que l'impact de la diagénèse y serait plus limité que dans la matrice osseuse au moins en ce qui concerne sa transformation en fluoroapatite. A moins que les compositions minérales originelles entre la ganoïne et l'os des écaillés soient légèrement différentes ?

L'origine du carbone observé dans ces structures (endogène, exogène ou mixte), reste à établir, de même que l'impact de la diagénèse sur les éléments observés. Néanmoins

ces mesures apportent un éclairage utile sur l'origine du contraste des structures fossiles en microscopie photonique.

Caractéristiques histologiques remarquables et implications.

***Canaliculi* de Williamson et *canaliculi* de Williamson de type II.**

Comme nous l'avons signalé précédemment, les tubules de 3 à 5,5 microns de diamètre qui prennent leur origine dans l'os pseudo-lamellaire et se propagent en ligne droite vers les parties profondes (les plus jeunes) de l'écaille (FIGURE 15), correspondent à la description des canaux non vasculaires de Williamson selon Ørvig (Ørvig, 1951), renommés *canaliculi* de Williamson par Sire et Meunier (Sire et Meunier, 1994). Ils peuvent être branchés, et leurs extrémités se présentent sous la forme d'un plumet caractéristique fait de deux ou trois prolongements cytoplasmiques en éventail (FIGURE 29).

D'autres tubules de même diamètre que les précédents (3 à 5 microns également) prennent leur origine non pas dans la partie osseuse mais dans la couche de dentine, ou à son interface (FIGURES 16 à 18). Leur structure souvent branchée, présente plusieurs extrémités situées parfois dans des unités successives de dentine. Ils correspondent à la définition des canaux vasculaires de Williamson décrits et illustrés par Schultze dans les écailles d'*Histionotus angularis* (Egerton) (FIGURE 11- cf. Fig.48a dans (Schultze, 1966)), et j'ai suggéré de les appeler provisoirement *canaliculi* Williamson de type II, car leur diamètre est similaire à celui des *canaliculi* de Williamson.

Ils possèdent à leur extrémité un faisceau de fins et longs prolongements cytoplasmiques. Celui-ci est très semblable morphologiquement aux canalicules odontoblastiques de la dentine. A moins que ces extrémités ne correspondent aux tubules de la dentine ? C'est l'interprétation qu'en donnent K. S. Thomson et A. McCune, d'après leurs observations d'écailles de *Semionotus* :

« *There is neither pulp cavity nor vascularization associated with the dentine but each arborescence of dentine tubules as a unit connects simply with a canal leading out to the lateral margins of the scale. This 'dentine canal' is superficially similar to a canal of Williamson, except for the terminal dentine tubules* » (Thomson & McCune, 1984b). »

Quant à moi, j'émetts l'hypothèse nouvelle que les *canaliculi* de Williamson et les *canaliculi* de Williamson de type II représentent des signatures histologiques différentes de canalicules issus de cellules de Williamson identiques.

Cette hypothèse repose sur les observations suivantes :

- Les deux types de *canaliculi* de Williamson possèdent des diamètres similaires, entre 3 et 5 microns. Ces diamètres sont relativement constants sur toute la longueur du canal, bien que des variations locales puissent exister.

- A ma connaissance, les *canaliculi* de Williamson de type II n'ont jamais été observés seuls mais apparaissent conjointement avec les *canaliculi* de Williamson.
- L'extrémité en plumet caractéristique des *canaliculi* de Williamson, avec des prolongements cytoplasmiques peu marqués s'étalant dans la direction des fibrilles de collagène, s'observe dans une matrice extracellulaire faite d'os pseudo-lamellaire ou lamellaire. L'extrémité en faisceau avec de nombreux prolongements cytoplasmiques s'étalant en éventail des *canaliculi* de Williamson de type II, s'observe dans une matrice extracellulaire constituée de fibres enchevêtrées sans organisation apparente visible sous microscope. De la même manière que les canalicules des ostéocytes se présentent sous deux formes très différentes selon qu'ils sont noyés dans de l'os pseudo-lamellaire ou de l'os fibreux, la variation de la forme des extrémités des deux types de *canaliculi* de Williamson pourrait être liée non pas à une différence de nature, mais plutôt à une différence de texture de la matrice extracellulaire environnante.
- Au sein des écailles que j'ai étudiées, la structure fine des canalicules odontoblastiques de la dentine apparaît très légèrement différente de celle des extrémités des *canaliculi* de Williamson de type II. Les premiers sont plus fins, plus divisés, avec des embranchements dendritiques souvent à angles droits (FIGURES 18 et 31).
- De même (et pour la même raison) que les arborescences cytoplasmiques des extrémités des *canaliculi* de Williamson alimentent la substance osseuse et sont en contact avec les prolongements cytoplasmiques des ostéocytes, celles des *canaliculi* de Williamson de type II pourraient établir des contacts avec les tubules de la dentine pour assurer une fonction trophique analogue à celle de « véritables » canaux vasculaires.

A cet égard les observations simultanées des deux types de *canaliculi* de Williamson présents sur une coupe verticale (lame mince n°JRE.550c, FIGURE 18) ou sur une coupe tangentielle (lame mince n°JRE.550d, FIGURE 30) de l'écaille référencée MNHN.F.JRE.550 sont intéressantes. Elles montrent en effet la grande similitude et la proximité spatiale de ces deux types de *canaliculi*. On peut observer sur la FIGURE 30, dans la partie osseuse située en haut de l'image, la jonction entre l'extrémité en plumet d'un *canaliculi* de Williamson et un ostéocyte. Tandis qu'au centre de l'image on distingue un *canaliculi* de Williamson de type II dont l'extrémité est constituée d'un large faisceau de fins tubules s'étalant en éventail dans la couche de dentine. Ses extrémités paraissent à première vue très semblables aux processus des odontoblastes. Ces derniers sont observés sur la droite de l'image. Ils présentent néanmoins une architecture très légèrement différente de celle des extrémités des *canaliculi* de Williamson de type II, notamment leurs ramifications de forme dendritique sont plus à « angles droits », comme le montre l'agrandissement de la FIGURE 31.

Observation de *canaliculi* de Williamson de type II au sein d'un os dermique

Une observation nouvelle mérite d'être signalée. Il s'agit de la présence de *canaliculi* de Williamson de type II, issus de canaux vasculaires (indiquant que la cellule de Williamson correspondante était localisée au sein du canal vasculaire) et dont les ramifications terminales sont en connexion avec les tubules de dentine de l'odontode d'un os dermique (lame mince n°JRE.548c-FIGURES 32, 33, et 38).

La présence des cellules de Williamson au sein des cavités vasculaires a déjà été signalée (Sire et Meunier, 1994). Il convient de rappeler que ces dernières interviennent de manière privilégiée dans le processus de formation des odontodes (Ørvig, 1977).

Les odontodes recouverts de ganoïne monostratifiée sont répartis de manière clairsemée à la surface des os dermique du spécimen JRE. 2008, comme sur celui référencé n°MNHN.F.JRE 548. Certains présentent une cavité pulpaire vide indiquant que l'odontode était probablement encore « actif » à la mort de l'animal (lame mince n° JRE.548c-FIGURE 38). La dentine est connue pour être un tissu vivant. Les odontoblastes reculant devant le front de minéralisation, laissent un processus qui s'allonge au fur et à mesure qu'elle s'épaissit, tandis que leurs corps cellulaires se situent sur les bords de la cavité pulpaire.

D'autres odontodes présentent un comblement partiel ou total de la cavité pulpaire par de la substance osseuse, qui est en contact direct avec la dentine. Dans ce cas les odontoblastes ne sont plus en connexion avec leur processus cellulaires, la dentine n'est plus « alimentée » par ces derniers et ne peut continuer à croître en épaisseur. En revanche on observe des *canaliculi* de Williamson de type II dont les extrémités sont en contact direct avec la dentine et qui émergent de quelques cavités vasculaires situées au sein de la substance osseuse à proximité de la dentine. Les cellules de Williamson ayant un rôle trophique (Sire et Meunier, 1994), il est envisageable qu'elles puissent alimenter également la dentine de nutriments après le départ des odontoblastes, comme elles le font pour la substance osseuse.

Par ailleurs je n'ai pas observé de *canaliculi* d'un diamètre de 3 à 5 microns au sein de la couche de dentine constitutive des odontodes alors que cette dernière est particulièrement développée.

Il paraît donc raisonnable d'envisager que les cellules de Williamson établissent des connexions avec la dentine probablement après le départ des odontodes de la surface de la cavité pulpaire.

Un mécanisme similaire pourrait intervenir au niveau des écailles.

Au vu de ces observations et remarques, on peut supposer que les *canaliculi* de Williamson et les *canaliculi* de Williamson de type II (que l'on a différencié au préalable) quand ils sont simultanément présents dans les écailles, constituent en fait deux signatures histologiques légèrement différentes des prolongements cytoplasmiques de cel-

lules de Williamson identiques. Ces dernières pouvant jouer un rôle trophique à la fois pour l'os et pour la dentine, suite à la rareté des canaux vasculaires (et/ou leur comblement) dans les écailles.

Cette hypothèse me semble la plus parcimonieuse vis-à-vis d'hypothèses alternatives impliquant par exemple l'existence d'une nouvelle population de cellules inconnues à l'origine de ces *canaliculi* de Williamson de type II et de nature différente des cellules de Williamson classiques ou des odontoblastes.

Un doute subsiste quant à confondre au plan histologique le prolongement cytoplasmique d'une cellule de Williamson avec le canal d'un capillaire sanguin, mais cela me paraît peu probable au vu des différences d'agencement de ces deux réseaux au sein des écailles.

Agencement de la dentine.

La dentine au sein des écailles du spécimen JRE.2008 se présente sous la forme de petites unités adjacentes situées sous les dentelures constituant l'interface avec la ganoïne. Sa répartition spatiale à l'interface de la ganoïne est inhomogène. Chaque unité de dentine est caractérisée par la présence simultanée de fins canalicules odontoblastiques, par des lignes de résorption sur ses bords dont la forme caractéristique est due aux lacunes de Howship, ainsi que par la signature occasionnelle d'une cavité vasculaire, qui le plus souvent est oblitérée. Enfin à chaque unité de dentine est associée une strate de ganoïne. Les caractéristiques présentées ci-dessus correspondent bien à la définition et à la morphogénèse d'un odontode selon Ørvig (Ørvig, 1977). L'ensemble des unités de dentine adjacentes au sein de l'écaille forme un odontocomplexe (Ørvig, 1978b). Ce mode de croissance de la couche de dentine, par croissance latérale odontodes juxtaposés, avec résorption du tissu osseux lors de l'apposition d'un nouvel odontode, rappelle celui observé dans les écailles de *Scanilepis* (FIGURE 28. cf. Fig. 1 dans (Ørvig, 1957)). Il diffère du mode de croissance de la dentine des écailles des Polyptères, fait à partir de dentéones qui fusionnent ensuite pour former une couche de dentine continue et vascularisée dans la partie supérieure de l'écaille (Sire *et al.*, 2009).

Je note que la dentine au sein des écailles du spécimen JRE.2008 est remarquablement peu développée en épaisseur. Cette dernière varie en moyenne entre 10 et 20 microns.

Description de l'initium (présence de dentine) et hypothèse sur sa formation.

La FIGURE 34 présente l'initium de l'écaille MNHN.F.JRE.549 coupée transversalement (lame mince JRE.549d). On y distingue à l'interface entre la ganoïne et l'os basal une fine couche de dentine dont l'épaisseur est d'environ 15 microns. Juste en dessous de la dentine, apparaît une couche d'os fibreux de 30 à 40 microns d'épaisseur selon l'endroit considéré, puis des couches d'os pseudo-lamellaire sous-jacentes. Cette

description diffère de celle de l'*initium* des écailles de lépisostées dont le rudiment d'écaille est totalement osseux.

Alors que le rudiment d'écaille des lépisostées se forme à l'intérieur du derme (dans sa partie supérieure), il apparaît dans une partie plus superficielle du derme chez les polyptères, presque à l'interface avec l'épiderme. Chez ces derniers la dentine est le premier élément formé. Il apparaît d'abord une papille dermique bien délimitée adjacente à l'épiderme (Sire *et al.*, 2009) qui va donner lieu à une couche supérieure irrégulière, constituée de patches de dentine fibreuse en association avec des vaisseaux capillaires (dentéones).

La présence d'une fine couche de dentine dans la partie supérieure de l'*initium* du spécimen JRE.2008 appuie l'hypothèse d'un rudiment d'écaille de nature odontogénique, initié par la condensation des cellules du mésenchyme en une papille dermique adjacente à l'épiderme.

Considérons l'organisation des *canaliculi* de Williamson au voisinage de l'*initium*. Ils sont situés sous la couche de dentine, et sont orientés uniquement en direction de la face profonde de l'écaille (FIGURE 34).

Cette organisation diffère de celle observée chez les lépisostées. Chez ces derniers, ils sont présents sur le pourtour de l'*initium*, certains des *canaliculi* étant dirigés non pas vers la face profonde mais vers la face supérieure de l'écaille.

L'organisation des *canaliculi* de Williamson répartis autour de l'*initium* chez les lépisostées s'accorde bien avec l'apparition d'un rudiment d'écaille d'origine ostéogénique, ancré au sein du derme, comme Sire a pu l'observer sur des écailles régénérées (Sire, 1994). La croissance du rudiment d'écaille se faisant par apposition de fibrilles de collagène sur toute sa périphérie, les *canaliculi* de Williamson peuvent se développer perpendiculairement aux fibrilles de collagène à partir de cellules de Williamson situées sur le pourtour de l'*initium*. Dans le spécimen JRE.2008, l'absence de *canaliculi* de Williamson orientés en direction de la surface de l'écaille au niveau de l'*initium* s'accorde bien avec un processus de formation du rudiment d'écaille de nature odontogénique.

Une répartition inhomogène de la dentine au sein des écailles

L'étude approfondie de la localisation de la dentine du spécimen JRE.2008 me semble intéressante pour tenter de cerner les mécanismes biologiques à l'origine de sa formation. Elle pourrait l'être également pour appréhender les mécanismes évolutifs conduisant à sa disparition.

Les FIGURES 35 et 36 représentent deux vues générales de la répartition de la dentine sur deux écailles distinctes du flanc de l'animal, et selon deux coupes perpendiculaires. La FIGURE 35 correspond à une coupe longitudinale (lame mince JRE.550c) réalisée du bord antérieur au bord postérieur d'une première écaille des flancs référencée n°

MNHN.F.JRE.550. La FIGURE 36 correspond à une coupe transversale dont l'orientation est perpendiculaire à la précédente, (lame mince référencée JRE.549d) réalisée du bord dorsal au bord ventral d'une deuxième écaille des flancs référencée MNHN.F.JRE.549. Ces deux coupes passent par l'*initium*. Une troisième coupe transversale (FIGURE 37 - lame mince référencée JRE.549.e) a également été réalisée au 2/3 du bord postérieur de l'écaille n°MNHN.F.JRE.559. Enfin nous avons observé l'agencement de la dentine au sein d'un petit os dermique provenant probablement de la région circumorbitaire, qui est orné d'odontodes recouverts de ganoïne monostratifiée (FIGURE 38 - lame mince JRE.548c).

Sur les FIGURES 35 et 36, j'observe une couche superficielle très discrète de dentine qui débute au niveau de l'*initium*, puis qui s'étend ensuite aux dentelures adjacentes marquant l'interface avec la ganoïne. Sur ces deux coupes faites selon des sections longitudinale et transversale, la couche de dentine s'arrête après un certain nombre d'incréments de dentelure, comptés à partir de l'*initium*.

Mesures faites sur une coupe longitudinale passant par l'*initium*.

Considérons la coupe longitudinale (lame mince JRE.550c) de la FIGURE 35 : sur 151 incréments mesurés de l'*initium* jusqu'au bord postérieur de l'écaille, 63 incréments correspondent à de la dentine. Je mesure à partir de l'*initium* 57 incréments adjacents de dentine, suivi d'une zone de transition de 12 incréments où les dentelures de dentine alternent avec des dentelures de nature osseuse. Cette zone de transition correspond à 6 incréments additionnels de dentine. Les 88 dentelures restantes jusqu'au bord postérieur de l'écaille sont uniquement de nature osseuse. Donc 42% des incréments formés au cours de la croissance du spécimen JRE.2008 durant sa vie correspondent à des incréments de dentine. Je suppose, par comparaison avec les données issues des travaux de Thomson et McCune (Thomson et McCune, 1984a), que ce dernier était adulte et avait même atteint un âge fort avancé d'après sa taille exceptionnelle pour un *Lepidotes* du Jurassique et le nombre considérable de ses incréments.

Si j'évalue l'étendue relative de la dentine le long de l'axe longitudinal de l'écaille, elle s'étend sur environ 43% de la demi-longueur de l'écaille mesurée de l'*initium* jusqu'à son bord postérieur. Notons que la partie antérieure de l'écaille ne présente pas de trace de dentine.

Il est intéressant de comparer ces données avec les mesures du nombre de dentelures chez des spécimens dont l'âge est connu. Comme précédemment décrit chez des lépisostées (Thomson et McCune, 1984a), la vitesse de dépôt des incréments est très rapide lors des deux premières années de vie puis diminue notablement ensuite. Ainsi chez un *Lepisosteus* mâle de 16 ans, 40% des incréments sont formés durant sa première année de vie, tandis que pour une femelle de 10 ans dont la croissance apparaît un peu plus rapide, cette proportion est de 35%. Enfin pour un *Lepisosteus*

platyrhinchus de 7 ans, 39% des incréments de l'écaille sont formés dès la première année. Chez un *Semionotus* fossile dont l'écaille possède près de 60 incréments, selon le mode de calcul de son âge estimé entre 5 et 6 ans, de 33% à 52% des incréments de l'écaille seraient formés lors de la première année de vie.

Sans connaître l'âge précis du spécimen JRE.2008, je peux néanmoins déduire grâce à la comparaison de mes mesures avec celles de Thomson et McCune, que la dentine s'est développée très probablement lors de la phase de croissance rapide de l'écaille, au cours de la première ou des deux premières années de sa vie. En effet de 30% à 50% des incréments de la dentelure sont produits durant les deux premières années de vie de lépisostées actuels et de *Semionotus* fossiles, deux groupes phylogénétiquement proches de mon spécimen. Je peux donc supposer que les 42% d'incrément de dentine du spécimen JRE.2008 ont également été produits durant la première ou les deux premières années de sa vie.

Mesures faites sur une coupe transversale passant par l'*initium*

Je constate sur la coupe transversale (lame mince JRE.559d) de la FIGURE 36 que la dentine est également présente au niveau de l'*initium* et qu'elle s'étend ensuite uniquement en direction du bord ventral de l'écaille. A partir de l'*initium* et en direction du bord dorsal, je n'observe pas de trace de dentine dans les différentes dentelures délimitant l'interface avec la ganoïne. Le nombre d'incrément de la dentelure qui est mesuré sur la coupe transversale est beaucoup plus important que celui de la coupe longitudinale : environ 286 incréments sont mesurés en direction du bord ventral et 284 en direction du bord dorsal, comptés à partir de l'*initium*. Les largeurs des demi-écailles mesurées à droite et à gauche de l'*initium* sont également sensiblement égales. Si j'évalue le développement de la dentine en direction du bord ventral de l'écaille, je dénombre seulement 37 incréments de dentine sur un total de 286 incréments mesurés depuis l'*initium*. La dentine représente ici seulement 13 % des incréments présents sur cette demi-largeur. Si je mesure sa répartition spatiale sur la coupe transversale, elle s'étend sur environ 23% de la demi-largeur ventrale. Cet écart est lié selon moi à l'étendue non négligeable de l'*initium* et à la taille moindre des incréments de dentelure sur cette coupe, qui sont mesurés le long de l'interface avec la ganoïne.

Observation de la dentine sur une coupe transversale située près du bord postérieur.

Je constate sur la coupe transversale (lame mince JRE.559e) réalisée à proximité du bord postérieur de l'écaille n°MNH.N.F.JRE.549 que la dentine est localisée seulement à deux endroits précis le long de cette coupe (FIGURE 37). Un examen attentif de l'orientation des couches d'os pseudo-lamellaire au sein de la coupe et la comparaison avec la partie postérieure de l'écaille me permettent d'identifier ces deux zones comme provenant des deux épines caractéristiques qui ornent sa partie postérieure. Le nombre d'épines situées sur la partie postérieure des écailles du spécimen JRE.2008 est variable

et comprise entre 1 et 6 épines en fonction de l'écaille considérée. Toutes les épines sont toutes situées sur la partie ventrale du bord postérieur.

La dentine est plus développée en épaisseur dans ces deux régions (de 50 à 80 microns). On peut y observer notamment (FIGURE 14) les processus odontoblastiques émanant d'une cavité vasculaire qui n'est pas oblitérée, et les nombreuses lacunes de Howship délimitant les unités de dentine adjacentes. Dans les autres régions de l'écaille où la dentine est présente (FIGURE 13), cette dernière est beaucoup moins développée en épaisseur (moins de 25 microns), les lacunes de Howship délimitant les unités adjacentes de dentine y sont moins nombreuses et les cavités vasculaires apparaissent souvent oblitérées.

Observation de la dentine au sein des odontodes d'un os dermique.

L'os dermique référencé n°MNHN.F.JRE.548, qui provient probablement de la région circumorbitaire, présente à sa surface quelques odontodes irrégulièrement répartis et recouverts de ganoïne monostratifiée. La lame mince JRE.548c correspond à une section transversale de cet os passant par six odontodes (FIGURE 38). Certains odontodes présentent une cavité pulpaire vide tandis que chez d'autres la cavité pulpaire a été partiellement voire presque totalement comblée par de la substance osseuse (FIGURE 33). Au sein de la dentine deux zones peuvent être distinguées :

- Une couche externe mince d'environ 40 microns d'épaisseur, où les terminaisons des processus odontoblastiques sont très fines et ramifiées avec une forme dendritique.
- Une couche interne beaucoup plus épaisse (d'environ 400 microns) s'étendant jusqu'à la cavité pulpaire et où les processus odontoblastiques se présentent sous la forme de longs tubules parallèles entre eux d'un diamètre d'environ 1,5micron.

Signalons que les fines extrémités ramifiées des processus odontoblastiques de la couche externe des odontodes ressemblent à ceux présents dans les unités de dentine des écailles, probablement à cause du faible développement en épaisseur de cette dernière.

Hypothèses de travail concernant la répartition hétérogène de la dentine au sein des écailles.

La dentine est répartie de manière inhomogène mais elle n'est pas répartie au hasard. Je résume l'ensemble de mes observations, encore fragmentaires, ci-après. Elles sont schématisées sur la FIGURE 39.

- La dentine est présente au niveau de l'*initium*.
- La dentine est présente au niveau des dentelures marquant l'interface avec la ganoïne.

- Son épaisseur est en moyenne très faible (de 10 à 25 microns)
- Sur les deux coupes longitudinale et transversale passant par l'*initium*, les unités de dentine sont contiguës selon une zone qui s'étend à partir de l'*initium* dans les directions postérieure et ventrale.
- La présence de dentine s'interrompt à partir d'un certain nombre de dentelures sur les deux coupes précédemment citées. Ce nombre est plus important selon l'axe antéro-postérieur que selon l'axe dorso-ventral.
- La dentine n'est pas observée, à partir de l'*initium*, en direction du bord antérieur et du bord dorsal respectivement sur la coupe longitudinale et la coupe transversale.
- La dentine est localement présente sous les deux pointes (ou denticules) situées sur le bord postérieur d'une écaille.

Je propose d'introduire et discuter la validité de trois hypothèses « de travail » pour tenter d'expliquer cette répartition inhomogène de la dentine à l'interface de la ganoïne :

- L'influence éventuelle du métabolisme ?
- L'influence éventuelle de contraintes spatiales et de l'organisation des écailles ?
- L'influence éventuelle d'une structuration particulière de l'épiderme ?

Première hypothèse : L'influence éventuelle du métabolisme ?

La formation de la dentine au sein des écailles apparaît plus importante durant les deux premières années de vie du spécimen JRE.2008. D'après les courbes de croissance relevées sur des lépisostées (Thomson et McCune, 1984a), cette période juvénile correspond à une croissance rapide associée à un niveau de métabolisme élevé. On pourrait donc émettre l'hypothèse que la formation de dentine soit éventuellement favorisée par un niveau de métabolisme élevé ?

Deuxième hypothèse : L'influence éventuelle des contraintes spatiales et de l'imbrication des écailles ?

Si j'admets que le pourcentage relatif d'incréments mesurés sur une demi-longueur ou une demi-largeur indique approximativement un même âge, indépendamment du choix de l'écaille, alors je dois faire intervenir un deuxième mécanisme pour expliquer l'écart chronologique lié à l'arrêt de la production de dentine entre les deux coupes transversale et longitudinale passant par l'*initium*. La production de dentine s'arrêterait de fait beaucoup plus précocement au niveau de la coupe transversale. Par ailleurs comment expliquer l'absence de dentine le long des demi-largeurs en direction du bord antérieur et du bord dorsal de ces mêmes coupes ?

Considérons l'agencement des écailles sur une rangée orientée ventrodorsalement et selon deux rangées adjacentes. La FIGURE 40 illustre un tel agencement sur un Lépisostée. On constate que les bords postérieurs et ventraux sont recouvrants, tandis que les bords antérieurs et dorsaux sont recouverts par les écailles adjacentes. L'épiderme qui couvre l'ensemble de l'écaillure présente des plis au niveau des bords postérieurs, et également dans une moindre mesure au niveau des bords ventraux.

Nous pouvons noter que la dentine est présente en direction des bords postérieurs et ventraux des écailles qui sont recouvrants, alors qu'elle est absente des bords antérieurs et dorsaux qui sont recouverts par les écailles adjacentes. Une observation similaire a été faite par Williamson en 1849 (Williamson, 1849).

D'après de nombreux auteurs (Ørvig, 1977 ; Schaeffer, 1977 ; Sire *et al.*, 2009), un contact direct avec la membrane basale de l'épiderme est nécessaire pour la formation d'une papille dentaire et la différenciation des cellules du mésenchyme en odontoblastes. Sachant qu'une fine couche de derme s'intercale la plupart du temps entre la surface des écailles et l'épiderme chez les lépisostées (Kerr, 1952), sauf lors des brefs épisodes de formation de la ganoïne où un contact direct se crée (Sire, 1994), cette couche dermique ne pourrait-elle pas empêcher la formation de la dentine chez cette espèce ?

Il me paraît envisageable que la distance entre la lame basale de l'épiderme et les bords en croissance des écailles du spécimen JRE.2008 où se forme potentiellement la dentine, puisse varier spatialement en fonction de la nature de ces bords qui sont de type recouvrant ou recouvert, mais aussi en fonction des différences d'imbrication des écailles au vu de leur grande variété de formes et d'agencement.

J'émet donc l'hypothèse, au moins en ce qui concerne les deux écailles des flancs dont j'ai étudié les coupes histologiques, que la distance entre la surface du bord en croissance et la lame basale de l'épiderme serait peut-être plus grande sur les bords antérieurs et dorsaux recouverts par des écailles adjacentes, que sur les bords postérieurs et ventraux qui recouvrent les écailles voisines. Cette contrainte topologique, à savoir disposer d'une proximité spatiale suffisante entre la lame basale de l'épiderme et le bord de l'écaille en croissance durant un temps donné pour pouvoir différencier les cellules du mésenchyme en odontoblastes, est une condition nécessaire à la production de dentine mais elle n'est pas suffisante. Ainsi selon cette hypothèse d'une contrainte topologique, la dentine ne pourrait pas être présente sur le bord antérieur des écailles et notamment au niveau des deux processus articulaires longitudinaux, car ils sont largement recouverts par les écailles adjacentes, et bien ancrés au sein du derme.

Cette deuxième hypothèse mériterait d'être davantage étayée, mais elle s'accorde bien à mes observations au sujet de la répartition spatiale inhomogène de la dentine sur les deux coupes longitudinales et transversales passant par l'*initium*.

Troisième hypothèse : L'influence éventuelle d'une structuration particulière de l'épiderme sur la localisation de la dentine ?

Cette dernière hypothèse m'est suggérée par la localisation particulière de la dentine sur la coupe référencée n° JRE.549d (Figure 37). Elle est en effet localement présente à deux endroits bien précis qui correspondent à la position des deux épines situées au bord postérieur de l'écaille n°MNHN.F.JRE.549 du spécimen JRE.2008. Mes deux premières hypothèses ne permettent pas d'expliquer cette dernière observation.

L'observation de dentine localisée sous les crêtes longitudinales caractéristiques ornant la surface des écailles de l'espèce *†Obaichthys africanus* a déjà été signalée (Meunier et al., 2016). Chez le genre *†Obaichthys* cette ornementation des écailles est particulièrement remarquable, et les crêtes ne sont pas disposées au hasard. Elles forment notamment chez *†Obaichthys decoratus* des lignes longitudinales continues et régulièrement espacées le long du corps du poisson, qui paraissent indépendantes de la forme et de l'imbrication des écailles qui les supportent (FIGURE 41).

Si la forme générale des écailles et de leurs imbrications est probablement sous le contrôle du mésoderme, la localisation des ornements superficiels des écailles sous forme de crêtes ou d'épines, et éventuellement de la dentine sous-jacente (si la généralisation de sa présence sous ces ornements est confirmée), ne pourrait-elle pas être gouvernée par une structuration particulière de l'épiderme ?

L'épiderme a la particularité de pouvoir générer des patterns remarquablement structurés, en termes d'ornements pigmentaires, qui ont fait l'objet de nombreuses études théoriques et expérimentales (Murray, 1988 ; Meinhardt, 2009), notamment chez les poissons (Kondo et Asai, 1995 ; Kondo et al., 2009). Des mécanismes similaires ne pourraient-ils pas être à l'œuvre et gouverner la localisation précise de la dentine au sein de la couverture écailleuse, sachant que sa formation nécessite l'établissement d'une interaction avec l'épiderme ?

Ces trois hypothèses « de travail » ne sont bien évidemment que des conjectures visant à proposer des mécanismes « plausibles » susceptibles d'expliquer la production inhomogène de la dentine au sein du spécimen JRE.2008. Elles reposent sur des observations encore fragmentaires de la localisation de la dentine qui devront être étayées par des études complémentaires pour être validées ou infirmées.

Etude des marques de croissance du spécimen JRE.2008

Remarques sur l'utilisation des incréments de dentelure

J'ai constaté précédemment que le nombre d'incrément de dentelures marquant l'interface entre la plaque basale des écailles et la ganoïne n'est pas le même quand il est mesuré selon deux coupes longitudinales et transversales passant par l'*initium*. Il s'agit ici d'écailles différentes mais de taille et de morphologie proches. Cette différence significative du nombre d'incrément mesurés sur la demi-longueur et la

demi-largeur (150 vs. 286) est-elle due à l'étendue plus importante de la dentine sur la coupe longitudinale n°JRE.550c, que sur la coupe transversale n°JRE.549d (42% vs. 13% du nombre relatif d'incréments), ou bien à la taille moyenne des incréments qui est plus importante sur la coupe longitudinale que sur la coupe transversale, ou bien au fait que ces deux coupes proviennent de deux écailles différentes ? Toujours est-il que ces différences viennent compliquer l'interprétation des relations entre le nombre d'incréments et l'âge relatif des spécimens qui ont été faites par Thomson et McCune (Thomson & McCune, 1984a). Elles n'ont pas été mentionnées par cet auteur, et nous ne connaissons pas l'orientation de ces coupes histologiques. A noter que les écailles fossiles dont il a étudié le pattern de croissance présentent également des traces de dentine à l'interface avec la ganoïne.

Si je mesure le nombre d'incréments à droite et à gauche de l'*initium* sur la coupe transversale, en suivant le contour de la fine marque de croissance correspondant à l'arrêt de la production de dentine, j'obtiens des valeurs respectivement de 37 incréments de dentine en direction du bord ventral et de 38 incréments de nature osseuse en direction du bord dorsal. A l'incertitude de mesure près, ces deux valeurs sont très proches, donc la nature de la dentelure, de type dentine ou osseuse, ne semble pas influencer leur nombre.

Comme le mentionnent Thomson et McCune (Thomson et McCune, 1984a): «the width of each new ring of ganoine, measured horizontally along the bone / ganoine interface, is roughly constant». Je confirme cette observation sur une coupe donnée. Par contre, pour les deux coupes transversales et longitudinales issues des deux écailles distinctes, il existe une différence notable de la largeur moyenne des incréments.

En conséquence, le nombre absolu d'incréments de dentelure d'une écaille ne peut pas être utilisé pour caractériser l'âge d'un spécimen. Par contre la mesure du pourcentage relatif d'incréments le long d'une coupe permet de corriger la variabilité existant d'une écaille à l'autre, et me semble donner une indication utile pour caractériser la croissance relative des écailles.

Marques de croissance présentes sur le spécimen JRE.2008

De très nombreuses lignes fines et bien marquées, visibles en microscopie optique, suivent le contour des écailles à un stade donné de sa croissance (cf. FIGURE 21). Elles ressemblent plus aux « delicate dark lines » que Thomson et McCune attribuent à des pauses temporaires dans le processus de croissance, qu'aux « heavily marked dark zones » qu'il associe aux changements périodiques majeurs qui me permettrait d'estimer l'âge du spécimen (Thomson et McCune, 1984a).

J'observe bien en lumière transmise des zones « étendues » de couleur noire au niveau des régions riches en fibres de Sharpey et dont on pourrait attribuer la couleur, comme le font Thomson et McCune pour les écailles de *Semionotus*, à un enrichissement local en matière organique (Thomson et McCune, 1984a). Ces fibres constituent en effet un

apport supplémentaire de collagène. Mais la manière irrégulière dont la couleur noire est répartie au niveau des fibres extrinsèques en se propageant parfois d'une fine ligne de croissance aux fibres de Sharpey adjacentes, ou bien au contraire en s'arrêtant brutalement, me fait envisager un rôle non négligeable de la fossilisation sur cette répartition (cf. FIGURE 21). Ces irrégularités, et le rôle complexe de la diagenèse rendent délicate selon moi l'attribution univoque d'une région présentant un contraste de coloration à une zone ou à un *annulus* sur du matériel fossile.

Minéralisation périodique des fibres de Sharpey.

En revanche, je note un changement périodique de la morphologie des fibres de Sharpey qui me semble être porteur d'une information plus facilement exploitable et plus fiable pour estimer les rythmes de croissance des spécimens fossiles.

Les fibres de Sharpey se présentent selon deux morphologies distinctes :

- Elles sont visibles en lumière transmise (champ clair) sous des formes ondulantes noires d'un diamètre moyen d'environ 1 micron (entre 0,8 et 1,3 micron), ou bien sous des formes ondulantes translucides. Fibres noires et fibres translucides ont la même apparence externe et le même diamètre (cf. régions A et C de la FIGURE 42). La différence de contraste entre ces deux régions est due à une différence de composition chimique provenant peut-être d'un remplissage de matière organique au sein des fibres de couleur noire. Comme je l'ai indiqué précédemment cette différence de contraste est liée selon moi à l'effet de la diagenèse, et non à une différence dans la nature originelle des fibres au sein de ces régions.
- Elles ne sont pas visibles, sur des régions peu étendues, en lumière transmise (cf. région B de la FIGURE 42), tandis qu'elles sont bien visibles sous la forme de bandes blanches en lumière polarisée-analysée ou en contraste interférentiel. En D.I.C (FIGURE 43) on observe également la présence additionnelle d'une striation à leur surface. Leur épaisseur est régulière et de l'ordre de 3 microns. Ces fibres blanches sont dans la continuité des fibres noires ou translucides décrites précédemment (FIGURE 44).

Cette alternance de la structure des fibres de Sharpey est liée d'après moi à un phénomène de minéralisation périodique de ces dernières, semblable à celui décrit par Ørvig sur les écailles d'*Holmesella* ? sp. (Ørvig, 1966).

Les régions (région B des FIGURES 42 à 44) où les fibres de Sharpey sont peu visibles en lumière transmise mais bien visibles en lumière polarisée et en D.I.C. sous la forme de bandes blanches striées d'environ 3 microns de large correspondraient selon moi à des domaines où les fibres ont été minéralisées (minéralisation inotropique) du vivant de l'animal. Comme le suggère Ørvig (Ørvig, 1966) les fibres extrinsèques minéralisent

préférentiellement lors des périodes de ralentissement de la croissance. Autrement-dit, ces régions pourraient correspondre à des « *annuli* ».

Les régions de plus grande étendue où les fibres apparaissent en lumière transmise sous la forme de filaments noirs ou translucides ondulants d'environ 1 micron d'épaisseur (régions A et C de la FIGURE 42) sont des régions où les fibres extrinsèques ne seraient pas minéralisées du vivant de l'animal. Autrement dit ces régions pourraient correspondre aux « zones », c'est-à-dire aux régions correspondant à des périodes de croissance rapide (par opposition aux « *annuli* »).

L'absence de visibilité en lumière transmise des fibres de Sharpey dans les régions où elles sont bien visibles en lumière polarisée-analysée est due à la faible différence d'indice de réfraction entre les fibres extrinsèques minéralisées et le milieu environnant constitué par des fibres intrinsèques également minéralisées. Les fibres ne se sont pas interrompues mais sont juste devenues invisibles en lumière transmise. La lumière polarisée-analysée permet de les révéler. Dans ce cas c'est l'orientation privilégiée des cristaux d'hydroxyapatite (ou de fluoroapatite), ayant minéralisé de manière inotropique au sein des fibres, qui est à l'origine du phénomène de biréfringence et de leur couleur blanche en lumière polarisée-analysée. A l'inverse les fibres de Sharpey non minéralisées sont invisibles en lumière polarisée-analysée car elles ne sont pas biréfringentes.

En conséquence les observations en lumière transmise et en lumière polarisée-analysées sont très complémentaires et permettent de visualiser l'intégralité des fibres de Sharpey.

Il est intéressant de noter que la morphologie et l'épaisseur des fibres de Sharpey est notablement différente selon qu'elles sont minéralisées ou non. Fines et ondulantes d'environ 1 micron d'épaisseur quand elles ne sont pas minéralisées, on les observe sous la forme de bandes plus larges d'environ 3 micron d'épaisseur, plus rectilignes et striées quand elles sont minéralisées. Je reviendrais au paragraphe suivant sur l'origine des striations. Ce phénomène particulier n'ayant pas encore été observé à ma connaissance.

L'observation faite en couplant lumière naturelle et lumière polarisée-analysée d'une différence périodique de minéralisation des fibres extrinsèques, me paraît être un indicateur plus « robuste » des cycles de croissance des spécimens fossiles que la seule observation d'un contraste de couleur au sein des régions.

Mes premières observations qualitatives indiquent, en partant des régions les plus profondes (les plus jeunes) au plus superficielles (les plus âgées) de la partie basale des écailles, un rétrécissement régulier de l'étendue des différents domaines (zones + *annuli*) où les structures des fibres extrinsèques alternent. Si l'alternance périodique de la minéralisation des fibres de Sharpey est sous le contrôle d'un phénomène extérieur périodique, comme une saisonnalité, alors ce rétrécissement traduirait le

ralentissement du métabolisme du spécimen au cours des différentes périodes sa vie, du stade juvénile jusqu'à un stade de vie très avancé.

Mise en évidence de stries sur les fibres de Sharpey.

Observations microscopiques.

Dans ce paragraphe, je présente quelques observations que j'ai réalisées sur des fibres de Sharpey isolées afin de décrire précisément leur structure.

La FIGURE 45 montre des fibres extrinsèques minéralisées observées en lumière naturelle et en contraste interférentiel. Elles sont presque invisibles en lumière naturelle mais se présentent sous la forme de bandes blanches striées en D.I.C. L'agrandissement de la FIGURE 46 permet d'évaluer la périodicité des stries sur ces dernières : elles sont ici régulièrement espacées d'environ 1 micron. Je note également que les stries sont perpendiculaires à l'axe de la fibre. La largeur des fibres extrinsèques varie légèrement d'une fibre à l'autre, de 2 à 3 microns, mais reste relativement constante le long d'une fibre donnée.

La FIGURE 47 permet de mettre en évidence la présence locale de fibrilles noires au sein et dans la prolongation des larges bandes blanches striées correspondant aux fibres de Sharpey minéralisées. Ces fibrilles noires sont parfois réunies en faisceau. Elles sont également extrêmement fines. J'estime leur épaisseur à 0,3 microns. Cette valeur est à considérer avec précaution car la largeur que je mesure correspond à la limite de résolution du microscope optique. Il s'agit ici très probablement de fibres de Sharpey partiellement minéralisées en leur centre, la fraction non minérale étant constituée des fibrilles noires. Il est en effet connu que les fibres de collagène constitutives de la matrice intrinsèque minéralisent en premier, suivi par la minéralisation des fibres de Sharpey qui s'étend de la périphérie jusqu'à leur centre et laisse ce dernier parfois incomplètement minéralisé (Jones et Boyde, 1974), (1).

Les fibres de Sharpey non minéralisées présentes sous la forme de fibres noires ondulantes (cf. les fibres observées dans la région C de la FIGURE 42), sont très

(1) A. Boyde, communication personnelle, 2016 : «Sharpey fibres are collagen fibres which insert (often more or less perpendicularly but also often at oblique angles) into a calcified tissue surface to attach the calcified tissue structure to something else, like a tendon or ligament – usually there has to be a muscle to exert a pull. Sharpey fibres are made external to the organ. In the process of mineralisation, the intrinsic matrix collagen which forms parallel with the surface of the forming tissue mineralises first, and the process spreads inwards towards the centres of the Sharpey fibres, very often leaving a non-mineralised centre in the Sharpey fibre – and that is what you are imaging, not the whole fibre itself. This is why you have a refractive index difference which makes it possible for you to see them with light microscopic methods. The process of growth of the calcified tissue surface which is incorporating the external Sharpey fibres is non-uniform – it is subject to diurnal (circadian) and longer period rhythms. The striations that you show are incremental lines, most probably daily. Some of your images show this exquisitely.»

probablement constituées d'un faisceau de fibrilles analogues à celles que j'observe sur la FIGURE 47.

Hypothèse sur l'origine des stries : un phénomène d'auto-organisation du collagène ?

D'où vient l'origine des stries que j'observe en Contraste interférentiel (D.I.C) sur les bandes blanches caractérisant les fibres de Sharpey minéralisées ? Ces stries n'ont pas à ma connaissance encore été signalées et leur origine reste donc à élucider. Elles sont très difficilement perceptibles en lumière naturelle, en contraste de phase ou en lumière polarisée analysée alors qu'elles apparaissent très nettement en D.I.C. Cette différence de visualisation provient selon moi de l'effet de « coupe optique » du contraste interférentiel qui permet de mettre en évidence des détails fins présents dans une coupe donnée, dont l'épaisseur est estimée à environ à 0,5 microns pour un objectif x100, en « nettoyant » les images provenant des plans de coupe voisins (Murphy *et al.*, 2012). Cette striation correspondrait-elle à des variations locales d'orientation des cristaux d'hydroxyapatite ? Ce phénomène rappelle en effet celui observé dans les structures en contre-plaqué du derme et de l'os lamellaire où les changements d'orientations réguliers des fibres de collagène entre strates successives induisent un phénomène d'extinction périodique de la lumière et la présence de bandes alternativement sombres et brillantes en lumière polarisée-analysée. Les observations de structures striées sont nombreuses dans le monde vivant mais aussi dans le monde minéral. Ainsi au sein des fibrilles de collagène, des stries caractéristiques sont observées en microscopie électronique à transmission, mais leur échelle est bien plus petite. Le muscle « strié » présente également une structure périodique caractéristique en microscopie optique. De même la précipitation de substances minérales dans certaines conditions physico-chimiques particulières conduit à une organisation régulière sous formes de bandes connues sous le nom de « Liesegang bands », comme le montre la FIGURE 48. Les stries seraient-elles un artéfact de fossilisation ?

Une analyse de la périodicité des stries en lien avec la matrice environnante me donne un premier élément de réponse. Cette dernière n'est pas constante mais peut varier du simple au double (entre 1 et 2 microns) d'une fibre à une autre, mais aussi entre deux régions distinctes d'une même fibre, comme le montre la FIGURE 49. Les fibres de Sharpey peuvent également se diviser, sans que cela altère la périodicité des stries. Enfin dans certaines régions elles n'apparaissent pas sur les fibres blanches.

D'après les nombreuses observations que j'ai réalisées, leur présence sur les fibres de Sharpey minéralisées semble conditionnée par la présence d'une texturation marquée de la matrice osseuse environnante constituée par des fibres intrinsèques de collagène caractéristiques de l'os pseudo lamellaire. Ces fibres intrinsèques de collagène de la matrice osseuse sont particulièrement épaisses dans le spécimen JRE.2008, elles apparaissent aussi dans la continuité des stries présentes sur les fibres extrinsèques et ce avec une périodicité similaire, comme le montre la FIGURE 51. Néanmoins leurs

directions respectives sont notablement distinctes. Les stries sont en effet toujours orthogonales à l'axe principal des fibres de Sharpey comme le montre la FIGURE 50.

J'en déduis que les stries observées sur les fibres extrinsèques ne proviennent pas d'une modification périodique de leur structure interne, mais sont probablement dues aux fibres intrinsèques présentes à leur surface. La variabilité de la périodicité pourrait refléter le rythme d'apposition non uniforme des incréments de croissance des fibres de collagènes intrinsèques de la matrice osseuse. D'après A. Boyde (communication personnelle, cf. note du bas de la page 41) ces stries pourraient peut-être même refléter un processus de croissance circadien de la matrice osseuse.

Si mon hypothèse rend bien compte des liens étroits qui existent entre les stries sur les fibres de Sharpey et la texture de la matrice collagénique environnante, elle n'explique pas pourquoi les fibres de collagène intrinsèques changeraient leur orientation moyenne pour se positionner perpendiculairement à l'axe des fibres extrinsèques, comme nous pouvons le voir sur la FIGURE 50.

Cette disposition particulière implique une interaction entre les fibres de Sharpey et les fibres de collagène intrinsèques qui soit à l'origine du changement local de direction de ces dernières. Mes recherches bibliographiques m'ont permis de découvrir que des fibrilles de collagène de la matrice extracellulaire peuvent parfois s'enrouler autour de fibres de collagène orthogonales, comme le montre la FIGURE 52 qui est issue de la thèse de Damien Subit (Subit, 2004). La FIGURE 53 tirée de cette thèse suggère l'hypothèse d'un ancrage des fibres orthogonales (dont l'analogie avec les fibres de Sharpey est tentante d'après cet auteur), grâce aux fibrilles de collagène s'entourant autour d'elles.

Je propose l'existence d'un mécanisme similaire pour expliquer mes observations. A savoir l'enroulement des fibrilles de collagènes intrinsèques autour des fibres de Sharpey lors de la formation de nouvelles strates osseuses. Il s'agirait ici d'une manifestation particulière de la propension des fibrilles de collagène à s'auto-organiser spontanément. L'analogie entre l'organisation des assemblées de fibrilles de collagène au sein de la matrice osseuse et les phases cholestériques des cristaux liquides a été établie depuis longtemps (Giraud-Guille *et al.*, 2003 ; Bouligand, 2006) . La structure collagénique en contreplaqué orthogonal ou en contreplaqué hélicoïdal des ostéones, de l'élasmodine ou du derme des écailles peut être obtenue spontanément *in vitro* pour des assemblées de molécules de collagène dans des conditions de concentration et de pH particulières. Il pourrait s'agir ici d'un phénomène d'auto-organisation particulier d'enroulement des fibrilles de collagène autour d'une structure collagénique préexistante. Si tel est le cas, il pourrait être envisagé de tenter de reproduire cet agencement particulier *in vitro* à partir de solution de collagènes dans lesquelles des fibres de collagène déjà formées seraient immergées.

Quel que soit le mécanisme à l'origine de l'enroulement des fibrilles intrinsèques de collagène autour des fibres de Sharpey puis de leurs minéralisations respectives, cette organisation particulière devrait permettre de renforcer l'attache des fibres de Sharpey avec la matrice environnante. Ainsi deux mécanismes distincts seraient à l'œuvre pour renforcer l'attache des écailles entre elles et au derme sous-jacent par les fibres de Sharpey : d'une part leur minéralisation périodique, et d'autre part l'enroulement de fibrilles intrinsèques de collagène autour de ces dernières.

Observations complémentaires sur l'orientation des fibres de Sharpey.

Dans ce paragraphe je présente une observation additionnelle que j'ai faite sur les fibres de Sharpey. Il me paraît important de signaler que l'orientation générale des fibres de Sharpey change entre les régions où elles sont minéralisées et celles où elles ne le sont pas. Ces changements de direction des fibres extrinsèques au sein de la matrice osseuse sont particulièrement visibles sur la FIGURE 54. Des changements d'orientation des fibres de Sharpey ont déjà été signalés, notamment au niveau du cément de dents d'herbivores. Ils seraient associés à des contraintes plus importantes exercées au niveau des fibres de Sharpey lors de la mastication de nourritures « dures », et se traduisent par un angle plus vertical de ces dernières vis-à-vis des lignes de croissance de la dent. Je cite D.E. Leberman: « Responses to a seasonally higher strain may be expected in cementum, given the high levels of strain from chewing. Cementum could respond to higher strains by: (1) increasing the number of collagen fibre bundles that attach it to the periodontal ligament; (2) growing more slowly, resulting in greater mineralization; and/or (3) mineralizing Sharpey's fibres at a more vertical angle during periods of increased occlusal forces »(Lieberman, 1994). Les causes primaires de la modification de l'angle des fibres de Sharpey entre les zones minéralisées et celles qui ne le sont pas sont bien évidemment différentes dans les écailles du sémionotiforme fossile décrit ici. Néanmoins l'impact éventuel de forces externes biomécaniques sur la modification de la direction des fibres de Sharpey n'est peut-être pas à exclure. Comme chez les dents d'herbivores, l'angle des fibres de Sharpey minéralisées (les fibres blanches sur la FIGURE 54) est plus vertical que celui des fibres non minéralisées (les fibres noires), vis-à-vis de la direction de croissance des fibres intrinsèques. Par ailleurs j'ai fait l'hypothèse que les fibres intrinsèques peuvent s'enrouler autour des fibres extrinsèques minéralisées et contribuer à les ancrer au sein de l'écaille. Nous pourrions supposer que cet enroulement induise des contraintes mécaniques supplémentaires sur les fibres de Sharpey et conduise à les réorienter de manière privilégiée perpendiculairement aux lignes de croissance de l'écaille ? Ce ne sont bien évidemment que des conjectures.

Conclusions, relations phylogénétiques et perspectives.

L'étude histologique des écailles du spécimen JRE.2008 a permis de mettre en évidence plusieurs aspects intéressants au plan paléo-biologique, systématique et évolutif. Je résume ci-dessous mes principales observations et hypothèses :

- Mise en évidence de *canaliculi* de Williamson et de *canaliculi* de Williamson de type II au sein des écailles. Ces structures histologiques apparaissent très proches et pourraient être selon moi issues de cellules de Williamson identiques. Si cette hypothèse est avérée l'emploi du terme « canal (ici *canaliculus*) vasculaire de Williamson » proposée par Ørvig est inadapté.
- Observation d'une hétérogénéité spatiale dans la répartition de la couche de dentine à l'interface entre l'os et la ganoïne du spécimen JRE.2008. Cette répartition hétérogène de la dentine n'est pas aléatoire. La dentine est présente au niveau de l'*initium*, en direction des bords postérieur et ventral de l'écaille, et localement au niveau des quelques dentelures présentes sur le bord postérieur de l'écaille. Trois hypothèses de travail ont été avancées pour tenter d'expliquer cette hétérogénéité spatiale de la dentine : 1) l'impact du métabolisme du poisson sur la production de dentine, 2) l'influence de la plus ou moins grande proximité spatiale de la lame basale de l'épiderme avec les bords des écailles en croissance, et 3) l'existence d'une structuration particulière de l'épiderme à l'origine à la fois des ornements caractéristiques observés sur les écailles (crêtes, stries, etc.) et de la dentine sous-jacente.
- Observation d'une minéralisation périodique des fibres de Sharpey probablement en lien avec la saisonnalité et les rythmes de croissance du spécimen JRE.2008.
- Observation en contraste interférentiel (D.I.C.) sous analyseur et polariseur croisés d'une striation périodique de 1 à 2 microns sur les fibres de Sharpey quand elles sont minéralisées. Je fais l'hypothèse que ces stries perpendiculaires à l'axe des fibres de Sharpey sont reliées aux incréments de croissance de l'écaille. Leur disposition pourrait correspondre à un phénomène d'auto-organisation particulier d'enroulement des fibres intrinsèques de la matrice osseuse autour des fibres de Sharpey, et servir à mieux ancrer ces dernières au sein de l'écaille.

Les conséquences de mes observations et hypothèses au plan systématique et évolutif sont les suivantes. Au plan systématique, le spécimen JRE.2008 fait partie de la famille des holostéens, *sensu* L. Grande (Grande, 2010), ce qui est confirmé par la présence de *canaliculi* de Williamson qui est un caractère diagnostique des holostéens et des sub-holostéens (Meunier, 2011). La présence de dentine est un caractère plésiomorphe. Si j'appose ce caractère sur une phylogénie existante (Lopez-Arbarello, 2012), elle est présente chez de nombreuses espèces sémionotiformes et lépisostéiformes au sein des

Ginglymodii, comme l'illustre la FIGURE 55, mais aussi en dehors du groupe des holostéens notamment chez les polyptères. Ce caractère plésiomorphe n'en fait pas un critère facilement exploitable au plan systématique. Elle pourrait fournir néanmoins des informations utiles au niveau paléo-biologique.

Concernant les perspectives d'études, il me semble important de chercher à confirmer ma première hypothèse relative à la nature des deux types de *canaliculi* de Williamson, qui sont présents simultanément dans les écailles du spécimen JRE.2008, et issus selon moi de cellules de Williamson identiques. Cette distinction entre canal vasculaire et canal non vasculaire de Williamson introduite par Ørvig (Ørvig, 1951), en lien étroit avec la théorie lépidomoriale et des hypothèses évolutives, a généré par la suite de nombreuses controverses et des confusions sur la nature de ces *canaliculi* qu'il serait utile de pouvoir définitivement clarifier.

Il me semble également intéressant de poursuivre les travaux visant à mieux cerner l'hétérogénéité spatiale de répartition de la dentine au sein des écailles des Holostéens et mieux comprendre son origine.

Pour cela il me paraît intéressant de pouvoir réaliser des observations histologiques complémentaires sur d'autres écailles de morphologie variée. L'abondance et la diversité des écailles du spécimen JRE.2008 le permet. La comparaison avec des écailles d'autres holostéens fossiles possédant de la dentine serait également intéressante, notamment pour vérifier si la présence de dentine serait également associée sur d'autres espèces à des ornements externes comme des crêtes ou des dentelures.

L'emploi de moyens d'investigation plus sophistiqués comme l'imagerie à 3 dimensions des structures histologiques en tomographie à haute résolution, mais aussi l'emploi de la microscopie confocale me semblent potentiellement riches d'informations complémentaires. Ces techniques d'imagerie 3D permettraient assurément de mieux visualiser la répartition spatiale hétérogène de la dentine en lien avec la répartition des *canaliculi* de Williamson de type II. Néanmoins une très haute résolution doit être atteinte afin de pouvoir visualiser ces structures fines complexes. La tomographie RX conventionnelle (CTscan) permettant difficilement d'obtenir une résolution inférieure au micron, des tomographies RX par lumière synchrotron pourraient être envisagées pour obtenir des résolutions submicroniques.

L'emploi des techniques de microscopie RAMAN confocale permettraient aussi de mieux connaître les compositions chimique et minérale des structures présentes au sein des écailles fossiles en lien avec la diagénèse. Cette connaissance me semble très importante afin de connaître plus précisément l'origine du contraste et interpréter plus sûrement les observations microscopiques.

L'étude plus approfondie de la minéralisation des fibres de Sharpey sur les spécimens actuels *Lepisosteus* et *Atractosteus*, en lien avec les marques de croissance saisonnières, permettrait d'envisager de manière plus robuste l'étude des rythmes de

croissances chez les holostéens fossiles et la connaissance de leurs paléo-environnements.

La compréhension des mécanismes à l'origine des changements d'orientation des fibres de Sharpey apparait également intéressante, surtout si des forces biomécaniques sont à l'œuvre.

Enfin si mon hypothèse d'un phénomène d'auto-organisation des fibres intrinsèques s'enroulant autour des fibres de Sharpey est vérifiée, il serait également intéressant de chercher à le reproduire *in vitro*, comme cela a déjà été fait pour les organisations de type cholestérique à partir de molécules de collagène en solution.

En conclusion mes premières observations histologiques réalisées à partir de cinq lames minces issues de deux écailles et d'un petit os dermique du spécimen JRE.2008 ne sont qu'une entrée en matière ouvrant sur des perspectives d'études nouvelles fort intéressantes !

Deuxième partie : Etude de l'ornementation des écailles ganoïdes

Historique

Description des ornements à la surface de la ganoïne.

L'observation au microscope électronique à balayage (M.E.B) des écailles révèle à la surface de la ganoïne la présence d'une ultra-sculpture constituée d'une série de microreliefs en forme de boutons et dont la base est arrondie ou ellipsoïdale. Ces microreliefs sont caractérisés par une hauteur submicronique de l'ordre de 0,5 micron, et un diamètre mesuré à la base compris entre 2 et 9 microns en fonction du taxon considéré. Ils sont régulièrement espacés et recouvrent la totalité de la surface de la ganoïne. La distance entre les bases des diamètres séparant deux tubercules voisins s'échelonne entre 2 et 10 microns en fonction du taxon considéré (Gayet et Meunier, 1986).

Cette ultra-sculpture a été observée pour la première fois en 1971 par R. Ermin et collaborateurs sur une écaille de *Polypterus endlicheri* (Ermin *et al.*, 1971) et par Schultze en 1977 sur une écaille fossile de *Dapedium* sp. (Schultze, 1977). Les microreliefs ont été nommés tubercules par de nombreux auteurs à la suite de Schultze puis renommés microtubercules en 2013 par Zylberberg et Meunier en rapport à leur dimension microscopique (Zylberberg et Meunier, 2013).

Gayet et Meunier en ont réalisé une étude exhaustive (Gayet et Meunier, 1986). Ils ont mis en évidence que le patron de microtubercules varie non seulement entre différents ordres, mais également entre différents genres, et entre différentes espèces. Pour un spécimen donné, ils ont observé que cette ornementation ne varie pas selon la position de l'écaille sur le corps du poisson, ni selon son mode de croissance. Leurs observations tendent à montrer aussi que l'ornementation ne varie pas en fonction de l'âge ou du sexe des individus. Ils ont enfin observé que les microtubercules sont présents non seulement à la surface des écailles mais aussi sur la ganoïne des os dermiques, des pinnules et des lépidotriches.

Ces diverses observations leur ont permis de conclure que cette ornementation est une donnée exploitable en systématique, qui serait fort utile pour aider à l'identification d'écailles isolées (Gayet et Meunier, 1986).

D'après Meunier et collaborateurs (Meunier *et al.*, 1986) ces microtubercules, associés à la couche intermédiaire qui assure la jonction entre l'épiderme et la ganoïne (Zylberberg *et al.*, 1985) pourraient avoir une fonction antidérapante afin de minimiser le glissement de l'épiderme sur les écailles durant la nage du poisson. Ils pourraient avoir aussi une fonction hydrodynamique visant à faciliter l'écoulement de l'eau durant la nage (Burdak, 1986).

Esin lors d'une étude sur le développement de la couverture écailleuse de poissons paléoniscides a observé que les microtubercules étaient de forme allongée au stade

juvénile puis de forme arrondie dès le stade sub-adulte (Esin, 1995). D'après lui les microtubercules de forme ellipsoïdale ont leur grand axe orienté préférentiellement selon la direction de croissance principale de l'écaille. Cet auteur relie l'apparition de la forme allongée des microtubercules à une croissance rapide durant le stade juvénile.

Trinajstić rapporte des observations similaires à celles d'Esin concernant l'évolution de la forme des microtubercules selon les stades de croissance sur un paléoniscide du Dévonien d'Australie (Trinajstić, 1999). Si cette hypothèse est confirmée alors la forme des microtubercules pourrait être reliée non seulement à des paramètres génétiques mais également à des paramètres ontogéniques et fournir des informations utiles au plan paléo-biologiques comme l'estimation des vitesses de croissance des écailles. Dutra et Malabarba reportent également la présence de microtubercules de forme fusiforme sur de toutes petites écailles indéterminées d'un actinoptérygien de l'Albien de Maranhão au Brésil (Dutra et Malabarba, 2001).

Komagata et collaborateurs observent que les microtubercules sont plus corpulents chez les mâles que chez les femelles de l'espèce *Polypterus senegalus*, et seraient donc aussi une caractéristique d'un dimorphisme sexuel (Komagata *et al.*, 1993).

Enfin la surface de la ganoïne n'est pas toujours ornementée par des microtubercules. Elle peut présenter parfois une surface lisse comme l'observent Smith et collaborateurs sur des écailles d'un polyptéridé du crétacé supérieur de la Formation Bahariya en Egypte (Smith *et al.*, 2006) ainsi que Meunier et collaborateurs sur des écailles de *Bawitius*, un polyptéridé de la Formation Kem-Kem au Maroc (Meunier *et al.*, 2016).

Méthode de mesure quantitative des microtubercules au M.E.B. : avantages et limitations.

Gayet et Meunier ont proposé une méthode de reconnaissance des taxons actuels et fossiles d'après leurs observations des microtubercules en microscopie électronique à balayage. Leur méthode est basée sur la mesure quantitative des diamètres délimitant la base des microtubercules et des espaces les séparant (Gayet et Meunier, 1986).

Les auteurs utilisent le protocole de mesures suivant (Gayet et Meunier, 2001) : sur une image scannée de la micrographie de la surface d'une écaille, prise à l'aide d'un microscope électronique à balayage à un grandissement donné (par exemple x700), ils tracent manuellement les limites de chaque microtubercule puis utilisent un logiciel pour mesurer les diamètres et les distances entre voisins. Les délimitations manuelles des contours sont refaites plusieurs fois. Une quarantaine de mesures de diamètres et une centaine de mesures de distances entre microtubercules sont réalisées sur une même image. Les valeurs moyennes des diamètres et des distances entre microtubercules sont issues de ces mesures. A noter que les distances entre microtubercules ne représentent pas les distances entre les centres des

microtubercules voisins, mais les distances entre leurs bases issues des délimitations manuelles.

Grâce à ces mesures quantitatives ils ont pu différencier des écailles de taxons polyptéridiformes de celles de taxons « lépisostéiformes + sémionotiformes » (Gayet et Meunier, 1993 ; Gayet et Meunier, 2001 ; Gayet *et al.*, 2002). Au sein de la famille Lepisosteidae, les espèces actuelles des deux genres *Lepisosteus* et *Atractosteus* sont également bien séparées d'après leurs mesures quantitatives (Gayet et Meunier, 1993).

Dans les cas d'écailles fossiles isolées provenant d'un même gisement, ces mesures leur ont permis de reconnaître de manière non destructive des écailles de Polypteridae au milieu d'écailles de Lepisosteidae présentant des caractéristiques morphologiques similaires (Gayet *et al.*, 1988).

Dans certains cas la distinction entre écaille polyptéridiforme et lépisostéiforme fossile à partir de la seule étude du patron de microtubercules peut présenter des difficultés quand les valeurs mesurées sont proches. C'est le cas par exemple entre †*PolLIA suarezi* (polyptéridiforme) et †*Paralepidosteus* (lépisostéiforme), mais l'étude histologique menée en parallèle a permis de lever cette ambiguïté (Meunier et Gayet, 1996). L'étude quantitative de l'ornementation des écailles sémionotiformes ne permet pas de les distinguer de manière certaine des écailles lépisostéiformes, bien qu'il semblerait que la répartition des tubercules à la surface de la ganoïne soit plus irrégulière chez les premières (Gayet et Meunier, 1993).

Bien que de nombreuses informations intéressantes au plan paléontologique aient été obtenues à ce jour avec la méthode quantitative décrite ci-dessus, elle reste néanmoins peu utilisée car elle présente des limitations importantes qui rendent son usage délicat.

La première limitation est relative à la délimitation manuelle des contours des microtubercules observés sur les images de microscopie électronique à balayage. En effet les images issues du M.E.B. sont naturellement ombrées et le signal représentatif d'un tubercule est de type « dérivé » avec une variation sinusoïdale du niveau de gris, mesuré selon son diamètre. Il n'est pas aisé de délimiter manuellement la base d'un tubercule sur de tels clichés en suivant un niveau de gris donné. Par ailleurs la délimitation d'un contour à l'œil reste subjective car dépendante des paramètres d'acquisition de l'image et en particulier de sa luminosité. Enfin pour obtenir un bon contraste visuel sur les images issues du MEB, il est préférable de « tilter » (incliner) légèrement la direction du faisceau d'électrons incidents par rapport à la normale de la surface de l'écaille. Ce tilt induit un effet de perspective et un biais sur les mesures relatives des distances en fonction de l'angle de tilt considéré. Enfin la surface des écailles est rarement plane et l'angle de tilt du faisceau électronique peut varier d'un endroit à un autre sur différentes images d'une même écaille.

En conséquence pour être parfaitement reproductibles, les délimitations manuelles des contours de base des tubercules doivent être si possible réalisées par une même

personne (le choix d'un contour donné autour d'un tubercule reste à l'appréciation de l'opérateur) selon le même protocole et sur des images prises dans les mêmes conditions d'acquisition (angle de tilt, niveau de luminosité, niveau de grandissement). Des mesures réalisées par deux opérateurs distincts sur deux microscopes électroniques à balayage différents avec des conditions d'acquisition non strictement identiques peuvent être entachées d'un biais qu'il convient d'estimer en réalisant par exemple des mesures quantitatives croisées.

La délimitation manuelle précise des contours des tubercules étant une opération délicate et fastidieuse, le nombre de contours mesurés manuellement dans un temps donné est nécessairement limité. On peut légitimement se poser la question si la mesure moyenne des diamètres d'une quarantaine de tubercules voisins est suffisamment représentative au plan statistique pour décrire une ornementation constituée de près d'un million de tubercules répartis sur la surface d'une écaille d'environ un centimètre carré.

Enfin l'observation au microscope électronique à balayage nécessite d'introduire dans la chambre d'observation des objets de petites dimensions comme des écailles isolées, qui bien souvent doivent être métallisés pour limiter les effets de charge. En conséquence l'accès à des observations sur des spécimens types en connexion issus des collections n'est pas aisé, car le prélèvement d'une écaille et sa métallisation induisent une dégradation du spécimen.

Mise au point d'une nouvelle méthode quantitative d'étude des microtubercules.

Objectifs.

En dépit des études réalisées jusqu'à présent de nombreuses interrogations subsistent concernant l'origine des variations du patron de microtubercules présent à la surface de la ganoïne, et son utilisation en systématique.

Quelle sont les différents facteurs à l'origine de la variabilité rencontrée ? En particulier quelle est l'influence relative des facteurs génétiques, ontogéniques et du dimorphisme sexuel ? Cette ornementation présente-t-elle une fonction particulière ? Varie-t-elle avec la position de l'écaille sur le corps du poisson et la flexibilité de la zone considérée lors de la nage, ou bien dépend-elle plutôt de contraintes biologiques de développement ?

Quelles informations nouvelles pourrait-on déduire d'une étude plus exhaustive de ces micro-ornementations au plan ontogénétique, phylogénétique, paléo-biologique ou environnemental ?

Pour répondre à ces questions, il faudrait pouvoir disposer d'une méthode de caractérisation des patrons de microtubercules qui soit simple et rapide à mettre en

œuvre, conduite à des résultats quantitatifs exploitables au plan statistique, et enfin qui n'abîme pas les spécimens des collections.

Mon objectif est de mettre au point et de proposer une nouvelle méthode d'étude de l'ornementation des microtubercules à la fois facile d'accès, rapide à mettre en œuvre, simple d'emploi et robuste au plan de la reproductibilité des résultats. Elle a pour ambition de lever les principales limitations de la méthode précédemment développée par Gayet, et de permettre des investigations plus détaillées des micro-ornementations sur du matériel plus exhaustif.

Présentation sommaire de la méthode et de ses avantages.

La méthode que je propose est basée sur la réalisation d'une réplique de la surface de la ganoïne au moyen d'un film plastique déposé sur cette dernière (un peel), puis de son observation en microscopie optique suivie d'un traitement automatisé des images numériques pour extraire rapidement des informations quantitatives provenant d'un grand nombre de microtubercules.

Elle présente plusieurs intérêts pratiques, vis-à-vis de l'observation directe des écailles en microscopie électronique à balayage :

- Elle permet de générer une base de données conséquente de patrons de microtubercules en réalisant sur place les empreintes d'écailles de spécimens remarquables, et notamment les espèces types (espèces actuelles ou fossiles), précieusement conservés dans les diverses collections des muséums. Les peels une fois réalisés ne prennent pas de place et se transportent aisément pour leur observation ultérieure avec un microscope optique. Ils se conservent au moins sur plusieurs dizaines d'années s'ils sont stockés convenablement à l'abri de la lumière, par exemple dans un registre.
- Elle permet également de vérifier plus facilement sur des spécimens complets ou sub-complets, sans les abîmer par des prélèvements d'échantillons, si les patrons de tubercules présentent ou non des variations en fonction de la position anatomique de l'écaille considérée.
- L'observation ultérieure des peels ne nécessite qu'un accès relativement aisé à un microscope optique dont sont équipés la plupart des laboratoires de recherche.
- Enfin, comme nous le montrerons, cette nouvelle méthode apparaît plus robuste que celle développée précédemment par Gayet (Gayet, 2001) à partir de l'exploitation des images de microscopie électronique à balayage.

Bref historique sur l'utilisation des peels

L'utilisation des répliques de surface et de leur observation en microscopie pour révéler des détails au sein d'échantillons fossiles date des années 1930 (Stewart & Taylor, 1965). Cette technique a été utilisée notamment en paléobotanique où elle a permis de

révéler des détails cellulaires au sein d'épithéliums. Les premières matières plastiques étaient déposées à l'état liquide sur les échantillons. Mais cette méthode présentait de grandes difficultés opératoires, car le plastique se rétractait lors de son séchage sur l'échantillon, et des bulles d'air étaient souvent incorporées. L'utilisation de films plastiques minces légèrement plastifiés par un solvant a considérablement simplifié la méthode et a également permis d'accéder à des observations microscopiques avec de plus forts grossissements (objectifs X₁₀ à X₁₀₀) mais au dépend d'une perte de contraste des images.

L'utilisation d'une technique de microscopie par contraste de phase au lieu de la microscopie en champ clair s'est avérée très utile car elle est bien adaptée à l'étude d'échantillons transparents présentant peu de contraste (Honjo & Fischer, 1965).

Afin de créer du relief et de générer des détails, souvent la surface des échantillons est au préalable attaquée par un acide (« surface etching ») avant la prise d'empreinte. Pour les échantillons dont la surface présente naturellement un relief cette attaque acide n'est bien évidemment pas nécessaire.

Cette technique des peels est aujourd'hui presque totalement délaissée au profit d'observations en microscopie électronique à balayage. Le M.E.B. permet en effet d'observer la surface des échantillons à des grossissements bien supérieurs à ceux obtenus en microscopie optique.

Je peux citer néanmoins une étude de 2005 (Fusun *et al.*, 2005) où les auteurs ont réalisé des observations microscopiques issues de peels sur des coupes de dents, préalablement attaquées à l'acide, pour des raisons pratiques. Leur motivation était de pouvoir générer rapidement de nombreuses observations à différents niveaux de profondeur au sein d'une dent. Pour cela, ils ont régulièrement abrasé une coupe histologique dont ils ont observé la surface à l'aide de peels réalisés après chaque niveau d'usure. Cela leur a permis de s'affranchir de la fabrication de lames minces sériées au sein de l'échantillon, ce qui demande beaucoup plus de temps de préparation.

Microscopie par contraste de phase.

Principe de la méthode.

Les répliques de surface réalisées à l'aide de films plastiques minces (quelques dizaines de microns) ne peuvent généralement pas être observées en microscopie optique à champ clair car le contraste des images est trop faible.

La microscopie par contraste de phase permet de lever cette limitation et d'obtenir des images détaillées avec de forts grossissements et un bon contraste sur des objets transparents.

La théorie sur laquelle repose cette technique a été développée par Zernike en 1934, ce qui lui a valu le prix Nobel de physique en 1953.

Je présente brièvement les principes de base de cette technique (Abramowitz *et al.*, <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/phasecontrast/phaseindex.html>). Ils me seront utiles pour discuter de la validité des mesures quantitatives que l'on peut générer avec ma méthode.

En microscopie optique, le contraste des images est dû à la différence d'intensité lumineuse entre l'environnement et les objets que l'on regarde.

En transmission, selon le mode champ clair, cette différence d'intensité lumineuse provient de la différence sélective d'absorption de la lumière entre l'environnement (le milieu de montage) et les objets. Ces derniers doivent bien souvent être marqués pour pouvoir être observés en champ clair.

En microscopie optique par contraste de phase, on exploite la différence de phase générée au passage de la lumière entre l'environnement et l'objet. Cette dernière est transformée en différence d'intensité lumineuse grâce à un dispositif optique constitué d'anneaux de phase situés au niveau du condenseur et des objectifs du microscope. Pour ce faire, on génère un phénomène d'interférences entre la lumière issue du milieu environnant et celle diffractée par l'échantillon, en manipulant un des deux rayons lumineux à l'aide des anneaux de phase.

La différence de phase (δ) qui est à l'origine du contraste est fonction de la différence des chemins optiques (Δ) de la lumière quand elle traverse l'objet et le milieu environnant. La vitesse de la lumière dépendant de l'indice de réfraction du milieu qu'elle traverse, il se produit un décalage de la phase entre deux faisceaux lumineux cohérents issus d'une même source s'ils traversent deux milieux d'indice n_1 et n_2 différents, sur une épaisseur donnée « e ». Pour une lumière de longueur d'onde λ nous avons la relation :

Différence de phase : $\delta = 2 \pi \Delta / \lambda$ avec différence de chemin optique : $\Delta = (n_1 - n_2) \cdot e$

On peut donc distinguer en microscopie optique trois types d'objets : des objets d'amplitude où le contraste est uniquement dû à une variation d'amplitude de la lumière, des objets de phase où le contraste est dû uniquement à une variation de phase de la lumière, et enfin des objets mixtes présentant à la fois une variation d'amplitude et de phase de cette dernière.

Application aux peels.

Les peels sont des films minces transparents présentant de très légères variations d'épaisseur correspondant aux reliefs de la surface dont ils ont pris l'empreinte. Ce sont donc uniquement des objets de phase, et la microscopie par contraste de phase est particulièrement bien adaptée à la visualisation de ces variations d'épaisseur.

Le contraste en intensité d'une image de microscopie optique par contraste de phase dépend de l'indice de réfraction et du chemin optique (d'après Murphy *et al.* dans [https://www.microscopyu.com/techniques/phase-contrast/introduction-to-phase-](https://www.microscopyu.com/techniques/phase-contrast/introduction-to-phase-contrast)

contrast-microscopy). Pour un peel dont l'indice de réfraction est de 1,5 monté à sec entre lame et lamelle (l'indice de réfraction de l'air est de 1) et présentant des variations d'épaisseurs allant jusqu'à 0,5 microns (correspondant à la hauteur des microtubercules), les différences de chemin optique et les différences de phase maximales explorées sont respectivement de :

$$\Delta = (1,5-1) \cdot 0,5 = 0,25 \text{ micron et } \delta = 2\pi \cdot 0,25/0,5 = \pi \text{ (lumière verte : } \lambda = 0,5 \text{ micron)}.$$

La différence de phase maximale explorée, à l'origine du contraste des images sur les peels ne dépasse pas une demi-longueur d'onde de la lumière verte. Pour un dispositif de contraste de phase positif (le plus usuel), et avec cette gamme de phase, les reliefs des microtubercules qui sont en creux sur les peels apparaîtront brillants.

Variations de la hauteur des microtubercules et variations d'intensité lumineuse.

Lorsque les objets sont uniquement des objets de phase et que la variation de phase explorée est faible, alors il existe en théorie une relation linéaire entre cette dernière et la variation d'intensité lumineuse à l'origine du contraste des images (Barone-Dugent *et al.*, 2002).

Les peels sont uniquement des objets de phase, et la hauteur des microtubercules varie entre 0,2 et 0,5 micron, comme nous le verrons plus loin avec nos observations de Microscopie à Force Atomique (A.F.M)). Pour les plus petits microtubercules, par exemple ceux dont la différence de chemin optique ne dépasse pas 0,125 micron ou un $\frac{1}{4}$ de la longueur d'onde de la lumière verte, il doit exister une relation linéaire entre leur profil de hauteur et le contraste d'intensité lumineuse observé (d'après Murphy *et al.* dans <https://www.microscopyu.com/techniques/phase-contrast/introduction-to-phase-contrast-microscopy>). Sachant que les systèmes d'acquisition numérique actuels à partir de capteurs CCD (Charge Coupled Device) ou CMOS (Complementary Metal Oxyde Semiconductor)² donnent également une réponse linéaire en niveaux de gris du signal d'intensité lumineuse, il serait tentant d'étalonner les profils de niveaux de gris des petits microtubercules en profils de hauteur.

Afin de pouvoir étudier les variations de hauteur relative au sein de la population entière des microtubercules il conviendrait d'immerger le peel dans un milieu comme de l'eau dont l'indice de réfraction est de 1,33. En effet sachant que l'indice de réfraction de l'acétate de cellulose, le plastique qui sert à faire les peels, est de 1,48, nous serions en mesure d'obtenir une correspondance linéaire entre les profils de niveaux de gris et les profils de hauteur, pour des microtubercules dont la hauteur maximale ne dépasse pas : $0,125/(1,48-1,33) = 0,8 \text{ micron}$.

² Un capteur CCD transforme les photons lumineux qu'il reçoit en paires électron-trou par effet photoélectrique, puis collecte les électrons dans le puits de potentiel maintenu au niveau de chaque photosite. Le nombre d'électrons collectés est proportionnel à la quantité de lumière reçue. Un capteur CMOS est composé de photodiodes, à l'instar d'un CCD, où chaque photosite possède son propre convertisseur charge/tension et amplificateur (https://fr.wikipedia.org/wiki/Capteur_photographique).

Malheureusement la microscopie par contraste de phase est affectée aussi par des artéfacts connus en anglais sous le nom de « halo » et « shade off » (d'après Murphy *et al.* dans <https://www.microscopyu.com/tutorials/shade-off-and-halo-phase-contrast-artifacts>), qui viennent perturber la relation de linéarité dont nous avons discuté, et dont l'ampleur relative dépend de l'objet considéré mais également du système de phase utilisé.

Ne sachant pas évaluer précisément pour l'instant l'effet perturbateur de ces artéfacts sur les images numériques correspondant aux observations des microtubercules en microscopie par contraste de phase (sont-ils ou non du second ordre sur les profils d'intensité de niveau de gris correspondant aux profils de hauteur supposé des microtubercules ?), il nous a paru prudent de ne pas corrélérer à ce stade de notre étude les profils d'intensité lumineuse en profils de hauteur.

Partie A. Réalisation de répliques de surface et observation en microscopie optique

Matériel utilisé.

- Films d'acétate de cellulose de 35 microns d'épaisseur, commercialisés par la société EMS (Electron Microscopy Sciences), Hatfield, PA 19440, United States.
- Microscope optique équipé d'un contraste de phase positif selon Zernike ou d'un contraste interférentiel. Pour réaliser des mesures quantitatives automatisées de l'ornementation des microtubercules, un microscope équipé d'un contraste de phase selon Zernike est nécessaire.
- Logiciel d'analyse d'image « ImageJ ». ImageJ est un logiciel gratuit téléchargeable sur internet à l'adresse suivante : <http://imagej.net/Fiji/Downloads>

Protocole de réalisation des répliques de surface (ou peels).

La surface de l'écaille ganoïde dont on veut faire la réplique est préalablement nettoyée afin de retirer les poussières, et dégraissée, dans des conditions douces par exemple avec un pinceau trempé dans de l'acétone, puis séchée avec une soufflette. Dans le cas de spécimens actuels conservés dans l'alcool, il convient de s'assurer que les cellules de l'épiderme ne recouvrent pas la ganoïne à l'endroit de la réplique et si besoin de retirer localement la couche de l'épiderme.

Un morceau du film d'acétate de cellulose est coupé aux dimensions voulues pour couvrir la surface à répliquer. Le film, tenu par une pince brucelles à une de ses extrémités, est immergé dans de l'acétone pendant deux à trois secondes pour le ramollir, puis il est déposé immédiatement et délicatement sur la surface à répliquer. Les forces générées par la tension de surface vont permettre une application ferme du film sur la surface à répliquer et il n'est pas nécessaire d'exercer une pression supplémentaire sur le film. Le film est laissé à sécher jusqu'à évaporation complète de

l'acétone avant d'être retiré de la surface dont on veut faire la réplique. Le temps de séchage du film d'acétate de cellulose dépend des conditions environnementales : compter 15mn ou plus de séchage du film à température ambiante s'il est déposé sur une écaille fossile ou sur une couverture écailleuse sèche, et de 30 mn à une heure de séchage s'il est déposé sur la couverture écailleuse d'un spécimen préalablement conservé dans de l'alcool. Le film, une fois séché, se retire facilement de la surface, et peut se conserver sans problème plusieurs années, par exemple en le maintenant à plat dans un registre. Si le film est retiré trop tôt de la surface de l'écaille, avant évaporation complète de l'acétone, il va se rétracter ultérieurement lors de l'évaporation de l'acétone résiduel et les mesures quantitatives des dimensions de la réplique seront faussées. Il convient également de réaliser les peels dans un endroit aéré et dépourvu de poussières pour éviter que ces dernières ne se déposent et adhèrent au film d'acétate de cellulose en cours de séchage.

La FIGURE 56 présente un peel en cours de séchage réalisé sur la couverture écailleuse d'un spécimen actuel, conservé en alcool, du genre *Lepisosteus* des collections du MNHN. L'écaillure a été débarrassée localement des restes de la couche épidermique sus-jacente au moyen d'un chiffon doux.

Observation du peel en microscopie optique (M.O.)

Le peel est monté à sec entre lame et lamelle avant d'être observé au microscope optique. Il est parfois nécessaire de recouper les bords externes du film qui peuvent présenter une légère surépaisseur afin que ce dernier soit mis bien à plat entre lame et lamelle. L'observation est réalisée en contraste de phase selon Zernike ou en contraste interférentiel (D.I.C), au grossissement x20 ou x40. Au grossissement x40 ou au grossissement x20 sur des peels de grandes dimensions (de plusieurs cm²), il est parfois nécessaire de réaliser plusieurs acquisitions d'images avec différentes mises au point compte tenu de la faible profondeur de champ des objectifs et des légers défauts de planéité du peel, une fois monté entre lame et lamelle.

La FIGURE 57 correspond à l'observation d'une réplique de surface d'une écaille de *Polypterus ornatipinnis* prise au microscope optique x20 équipé d'un contraste interférentiel (D.I.C). Les microtubercules sont bien visibles et nets sur tout le champ d'observation. Ils présentent un ombrage lié au D.I.C. qui rend délicates les étapes de seuillage et la mesure automatique des diamètres au moyen d'un logiciel de traitement d'image en exploitant les contours définis par un niveau de gris donné.

La FIGURE 58 présente l'observation d'une réplique de surface d'une écaille d'*Erpetoichthys callabaricus* réalisée au grossissement x40. Le peel n'étant pas suffisamment plan entre lame et lamelle, la profondeur de champ à ce grossissement ne permet pas d'avoir une image nette des microtubercules sur tout le champ d'observation. A noter que les images en contraste de phase selon Zernike ne

présentent pas d'effet d'ombrage, ce qui rend la mesure des contours et des diamètres des microtubercules possibles avec un logiciel de traitement d'image.

La FIGURE 59 donne un exemple d'image composite faite avec le plugin "Stack focus" du logiciel Image J, à partir d'une pile d'images réalisées avec différents niveaux de mise au point selon Z au grossissement $\times 40$. Ce traitement a pour effet d'augmenter artificiellement la profondeur de champ du microscope optique. Les microtubercules caractéristiques de l'ornementation sont alors nets sur tout le champ d'observation, contrairement à l'image précédente prise au même endroit et au même grossissement (Bercovici *et al.*, 2009).

Partie B. Etude quantitative de l'ornementation des microtubercules avec « ImageJ »

Mesures quantitatives manuelles et nouveaux descripteurs utilisés.

Dans le cas d'images de mauvaise qualité, par exemple réalisées sur une écaille abîmée ou usée qui présente de nombreux défauts topographiques additionnels à l'ornementation des microtubercules (rayures, poussières, etc.), il est préférable de réaliser une mesure manuelle des dimensions sur une sélection représentative de microtubercules.

Pour cela, avec le logiciel image J et l'outil "straight line", il suffit de tirer une ligne droite entre deux microtubercules voisins, en veillant à passer au centre de chaque microtubercule, puis d'utiliser l'outil "plot profile" donnant le profil de niveaux de gris sur le segment de droite considéré. Les diamètres et la distance entre deux microtubercules voisins peuvent être ainsi déterminés à partir du profil obtenu (cf. FIGURE 60). Ce protocole est répété afin d'obtenir un nombre représentatif de mesures pour caractériser l'ensemble de l'ornementation.

Proposition d'un nouveau descripteur pour définir la distance entre deux microtubercules.

Concernant la définition de la distance entre deux microtubercules voisins, je propose de prendre comme descripteur, comme indiqué sur la FIGURE 60 n°2, l'intervalle séparant les centres de chaque microtubercule. Le centre du microtubercule est défini par le point correspondant au maximum local de niveau de gris. Ma définition diffère de celle utilisée par Gayet qui utilise non pas la distance séparant les centres de deux microtubercules voisins, mais la distance séparant leurs bases respectives (Gayet et Meunier, 2001).

Discussion sur la notion de contour d'un microtubercule et choix d'un nouveau descripteur.

La notion de contour d'un objet spatialement bien délimité apparaît évidente, mais sa transposition au contour ou au diamètre de base d'un microtubercule est plus délicate.

L'ornementation des microtubercules correspond en effet à des variations topographiques présentes à la surface de la ganoïne et non à des objets. L'analogie serait un paysage constitué de petites collines juxtaposées : Les reliefs sont certes localisés, mais leurs pentes sont douces et la base des collines n'est pas toujours bien délimitée de la plaine environnante.

Parfois les bases des microtubercules semblent se toucher sur les profils de niveaux de gris alors que les observations faites sous le microscope et d'après les images numériques nous présentent des taches lumineuses qui apparaissent bien séparées sur un fond noir. Ce phénomène est bien illustré au niveau des tubercules n°2 et n°3 de la FIGURE 64. Cela provient probablement du fait que la sensibilité de l'œil à la lumière est logarithmique (loi de Weber-Fechner), et donc plus celle-ci est intense et moins on perçoit ses petites variations(https://fr.wikipedia.org/wiki/Loi_de_Weber-Fechner).

Pour la mesure du diamètre d'un microtubercule, comme indiqué sur la Figure 60 n°2, je propose de prendre comme descripteur non pas le diamètre mesuré au niveau du contour de base, mais la valeur du diamètre mesuré au tiers inférieur de sa hauteur, qui est exprimée en pourcentage de niveaux de gris.

Justification du choix des deux nouveaux descripteurs.

Le choix de ces deux nouveaux descripteurs est dicté par des considérations à la fois théoriques et pratiques.

D'une part la détermination visuelle du contour de base d'un microtubercule sur une image est subjective et dépend de ses conditions d'acquisition et en particulier de sa brillance. D'autre part le contour de base d'un tubercule est délicat à séparer du fond lumineux même sur des profils d'intensité de niveaux de gris. Sa mesure peut nécessiter des corrections complexes de la ligne de base. Les sommets des microtubercules sont quant à eux bien mieux définis topographiquement au vu de leur profil.

La précision de la mesure relative des diamètres et des distances des microtubercules est donc significativement améliorée avec le choix de mes nouveaux descripteurs.

D'autre part ce choix facilite également l'étape ultérieure de seuillage automatique des microtubercules dans le cadre du traitement automatisé des données qui sera présenté plus loin.

Impact du temps d'exposition des prises de vue et de la luminosité des images.

La FIGURE 61 montre l'impact de deux temps d'exposition significativement différents (50ms vs. 150ms) de la prise de vue avec l'appareil photographique numérique du microscope optique. Ils sont réalisés sur une même zone d'observation du peel et dans les mêmes conditions d'éclairage du microscope et d'acquisition numérique.

Bien que les valeurs des niveaux de gris diffèrent en absolu sur les deux images, les profils de niveaux de gris servant à caractériser les dimensions relatives des microtubercules sont comparables pour les deux temps d'exposition.

Les contours des microtubercules apparaissent légèrement plus larges sur l'image prise avec le temps d'exposition de 50ms comparativement à celle prise avec le temps d'exposition de 150 ms. Il s'agit d'un effet optique lié à notre perception visuelle des variations d'intensité lumineuse. Contrairement à une délimitation subjective de contours tracés à la main, l'utilisation des profils de niveaux de gris pour déterminer les dimensions des tubercules permet d'exploiter des images prises dans des conditions d'acquisition et de luminosité différentes. Notre méthode est donc indépendante des conditions d'acquisition des images et de l'appréciation subjective des contours par différentes personnes.

Intérêt de la macro "Focused stack" pour les mesures quantitatives des diamètres.

La détermination quantitative du diamètre d'un microtubercule nécessite de disposer d'une image optique nette avec une mise au point qui a été faite localement sur la zone de mesure considérée. Du fait des légers défauts de planéité éventuels des peels montés à sec entre lame et lamelle et de la profondeur de champ limitée des objectifs, l'image de l'ornementation n'est pas toujours nette sur tout le champ d'observation. Une image légèrement floue localement par suite d'un défaut de mise au point va induire un élargissement apparent du diamètre des microtubercules à cet endroit. Ce phénomène est illustré sur la FIGURE 62 comparant deux images et les profils d'intensité associés, réalisés sur une même zone d'observation avec deux réglages différents de la mise au point.

Sur l'image (1) de la FIGURE 62, la mise au point a été faite précisément sur la zone d'observation considérée : les images des microtubercules sont nettes et il est possible de mesurer précisément leurs diamètres à partir du profil d'intensité donné par l'outil "plot profiles". Sur l'image (2) de la FIGURE 62, la mise au point a été faite à un autre endroit du même peel : les microtubercules apparaissent localement flous et leurs diamètres sont élargis comme le montre le profil d'intensités de niveaux de gris. Les mesures quantitatives des diamètres seront alors entachées d'une erreur significative aux endroits où la mise au point n'est pas correcte.

L'acquisition d'une pile d'images prises avec différentes mises au point selon Z et leur traitement sous image J, par exemple avec le plugin "stack focuser" permet de s'affranchir de ces difficultés de mise au point locales, en obtenant une image nette sur un large champ d'observation (Bercovici *et al.*, 2009). Comme le montre la FIGURE 63, la mesure quantitative d'une pile d'images avec différents niveaux de mise au point selon Z et traitées avec le plugin "stack focuser" donne une image composite (3) dont le niveau de netteté et dont les profils d'intensité en niveaux de gris sont comparables à ceux de l'image (1) qui a été mise au point localement.

En conséquence l'acquisition d'une pile d'images avec différents niveaux de mise au point et leur traitement avec le plugin "stack focus" permettra d'exploiter quantitativement des champs d'observations plus larges et de réaliser des mesures semi-automatiques sur un plus grand nombre de microtubercules, en vue de leur traitement statistique ultérieur.

Méthode de mesure semi-automatique des microtubercules.

Intérêt d'une méthode de mesure semi-automatique.

La mesure manuelle des diamètres des microtubercules et des distances entre voisins est longue et fastidieuse, or il est nécessaire de disposer d'un nombre de mesures suffisamment grand pour être représentatif au plan statistique de la globalité de l'ornementation des microtubercules présents à la surface de l'écaille. Une méthode de mesure automatisée apparaît donc nécessaire pour accéder à des résultats statistiques (moyenne, écart type) qui soient bien représentatifs de l'immense population de microtubercules présents sur une écaille. On peut estimer ce nombre être de l'ordre d'un million sur une surface de ganoïne d'environ un cm².

Discussion sur une méthode de seuillage adaptée.

Pour réaliser des mesures automatisées sur des objets issus d'une image numérique, il est nécessaire de rendre binaire au préalable l'image avec un seuil dont l'intensité correspond généralement à un niveau de gris fixé. Seuls les objets de l'image dont les intensités sont supérieures au seuil d'intensité lumineuse choisi seront comptés et mesurés. Dans notre cas, le niveau du seuillage ne peut pas être choisi au niveau de la ligne de base des microtubercules sous peine d'introduire de nombreux artéfacts de mesure. Le fond lumineux des images présente en effet des irrégularités notables de niveaux de gris bien visibles sur les profils d'intensité et qui interfèrent avec les mesures des bases des microtubercules. Les microtubercules ayant des valeurs d'intensité maximale de niveau de gris qui sont variables, un seuillage global de l'image avec un niveau de gris donné va introduire également un biais dans les mesures relatives des diamètres. Les dimensions des microtubercules de faible intensité lumineuse seront en effet sous-estimées vis-à-vis de celles de microtubercules présentant une intensité lumineuse plus importante.

Comme le montre la Figure 64, les diamètres des microtubercules (1) et (2) de plus faible intensité lumineuse sont ici sous-estimés par rapport au diamètre du microtubercule (3) de plus forte intensité lumineuse dans le cas du seuillage global de l'image réalisé avec un niveau de gris fixé. Le seuil a été choisi ici au niveau de gris 70, sur une image de 8 bits présentant 256 niveaux de gris. Par contre si chaque tubercule peut être seuillé de manière individuelle alors les rapports de dimensions entre microtubercules pourront plus facilement être conservés lors de l'étape de binérisation.

La méthode semi-automatisée de mesure quantitative des microtubercules que j'ai développée permet de s'affranchir des biais de mesures liés à un protocole de seuillage global de l'image. Je réalise un seuillage local autour de chaque microtubercule, avec un niveau dont l'intensité est réglée au tiers inférieur de la hauteur de chaque microtubercule, exprimée sur l'échelle des niveaux de gris. Cette valeur du seuillage au tiers de la hauteur du maximum d'intensité lumineuse de chaque microtubercule, qui est présentée sur la FIGURE 64, a été choisie car elle fournit des dimensions de tubercules proches de celles qui seraient mesurées à la base des microtubercules, mais sans risque de générer des artéfacts dus aux variations d'intensité du fond lumineux (background). D'autre part ces dimensions sont proches aussi de celles que l'on obtiendrait de manière subjective à partir de contours délimités manuellement directement sur les images des peels (cf. l'image (3) de la FIGURE 65).

Présentation du protocole de mesure semi-automatisé.

Mon protocole de mesure automatisé se décompose en quatre étapes (Les macro-programmes utilisés sont donnés en annexe) :

- Etape n°1 : à l'aide du logiciel image J chercher les maxima relatifs d'intensité sur l'image, qui correspondent au sommet des tubercules, avec l'outil "find maxima".
- Etape n°2 : définir les domaines de Voronoï associés à l'ensemble des points maxima précédents avec l'outil "Binary / Voronoï". A chaque microtubercule est associée une cellule de Voronoï qui l'entoure et qui est utilisée pour définir le fond lumineux environnant et réaliser un seuillage local (cf. l'image (1) de la FIGURE 65)
- Etape n°3 : chaque microtubercule, après seuillage local au tiers inférieur de son intensité lumineuse maximale exprimée en niveau de gris, peut être mesuré au niveau de sa surface, de son diamètre ou de son périmètre et décrit au niveau de sa forme, qui peut être circulaire ou plus ou moins allongée, avec divers paramètres (Circ., AR, Round) ; (cf. l'image (3) de la FIGURE 65). Il est important pour les mesures quantitatives que les images ne soient pas saturées lors de leur acquisition préliminaire, et éviter également tout traitement numérique lors de l'acquisition ou lors d'une phase de post-traitement, conduisant à une modification de l'échelle des niveaux de gris. Les modifications pour « améliorer » le contraste ou la luminosité des images sont proscrites.
- Etape 4 : Recherche du plus proche microtubercule voisin associé à chaque microtubercule et mesure des distances entre les centres des plus proches voisins (cf. l'image (3) de la FIGURE 65).

J'ai créé sur ImageJ différents macro-programmes, donnés en annexe, permettant l'automatisation des étapes 1 à 4 de mon protocole. Ce dernier reste néanmoins semi-automatisé car sur des images à champ large intégrant un grand nombre de microtubercules, la qualité de la surface de la ganoïne étant rarement parfaite,

quelques objets liés à des défauts topologiques ou à des artéfacts de seuillage, sont comptabilisés comme des tubercules lors du seuillage. Il apparaît donc utile de « nettoyer manuellement » les images numériques de ces objets pour éviter de les comptabiliser dans les mesures des microtubercules. Cela permet de réduire les écarts types mesurés aux seules variations présentes dans le pattern de microtubercules.

Ce traitement a peu d'effet sur les valeurs moyennes des mesures des microtubercules, le nombre de défauts topologiques après binérisation étant réduit comme le montre la FIGURE 66. Mais il permet d'obtenir des écarts-types de mesures qui soient plus représentatifs des variations intrinsèques de l'ornementation, sans y ajouter un bruit additionnel lié aux défauts de traitement inhérents au protocole automatisé de l'analyse d'image.

Validité de la méthode : Comparaison avec d'autres méthodes d'observation.

Microscopie électronique à balayage.

Comme le montre la FIGURE 67, le choix de mesurer les distances entre les sommets des microtubercules au lieu de mesurer les distances entre leurs bases induit une représentation différente des groupes d'écailles de celle qui est figurée par Gayet et Meunier (Gayet et Meunier, 2001), mais les regroupements d'écailles en fonction des principaux genres apparaissent conservés.

Aux grossissements utiles pour visualiser une collection de microtubercules et en mesurer les dimensions, les observations de microscopie optique des répliques de surface offrent des images similaires à celles qui sont obtenues en microscopie électronique à balayage. Pour s'en convaincre, il suffit de comparer par exemple la Figure 68 de la surface de la ganoïne prise au MEB avec la Figure 57 correspondant à l'observation en microscopie optique d'une réplique de surface de cette dernière (peel).

On pourrait se demander si la réalisation d'une réplique de surface entraîne un biais dans la mesure des dimensions sur les peels ? Ce n'est pas le cas. Comme le montre la FIGURE 69 les distances et les angles entre des objets mesurés en microscopie optique sur une réplique de surface d'une écaille sont très proches de ceux mesurés directement en microscopie électronique à balayage. Les écarts relatifs des mesures entre les deux méthodes varient en effet ici entre 2 et 5 %, ce qui reste tout à fait acceptable.

Par ailleurs, comme nous l'avons déjà indiqué, la microscopie électronique à balayage ne donne pas nécessairement des mesures quantitatives absolues qui soient plus justes que celles mesurées sur les peels. Nous avons cherché à estimer de combien les distances entre microtubercules mesurées au MEB peuvent être affectées par l'angle de tilt entre le faisceau électronique incident et la surface de l'échantillon. Comme le montrent la FIGURE 70 et le TABLEAU 4, les écarts relatifs de mesure peuvent atteindre 15% sur une direction donnée si l'angle de tilt varie de 20°.

Au niveau du contraste d'intensité lumineuse, exprimé en échelle de niveaux de gris, comme le montre la FIGURE 72, les profils d'intensité des microtubercules apparaissent beaucoup plus bruités au MEB que ceux obtenus sur les peels, probablement à cause de leur relief faible et aplati. Par ailleurs les contours des microtubercules ne peuvent pas être définis par un niveau de gris donné en microscopie électronique à balayage, suite à un effet d'ombrage, comme le montre la FIGURE 71 et le profil d'intensité (a') de la FIGURE 72. Cet ombrage est intrinsèque au MEB, car il est lié à la position relative fixe du détecteur d'électrons secondaires vis-à-vis de la pente des reliefs observés. En conséquence les images de MEB sont très difficiles à seuiliser avec des protocoles usuels d'analyse d'image.

Les observations au MEB apparaissent donc moins adaptées que la méthode des peels et leur observation en microscopie optique par contraste de phase, pour l'étude semi-automatisée des ornements de microtubercules d'un grand nombre d'échantillons.

La comparaison des mesures de distances faite sur les images des peels réalisées en microscopie optique par contraste de phase avec celles déterminées à partir d'observations directes de la surface en microscopie électronique à balayage, nous montre que notre méthode est par contre très bien adaptée, et sans biais apparent, pour la mesure des distances entre microtubercules.

Microscopie à force atomique.

Principe de la microscopie à force atomique.

Les diamètres et la densité de microtubercules ne suffisent pas à caractériser à eux seuls l'ornementation de la ganoïne. Il manque en effet une information descriptive importante relative aux différences de hauteurs des microtubercules et aux profils de rugosité de la surface de la ganoïne.

L'information concernant les profils de hauteur des microtubercules n'est pas directement accessible sur une image de microscopie à balayage et nécessiterait de réaliser plusieurs images MEB selon des angles de tilt différents.

La microscopie à force atomique permet quant à elle d'accéder plus facilement et de manière quantitative à cette information. Développée dans les années 1980, son principe est basé sur l'exploration physique de la topographie d'une surface à l'aide d'un levier au bout duquel est situé une pointe extrêmement fine (dont le rayon de courbure varie entre 5 et 20 nm) et que l'on appelle un cantilever. Le cantilever vient sonder la surface de l'échantillon, une force d'interaction entre la pointe et la surface s'établit et est mesurée grâce à la déflexion du cantilever qui lui est proportionnelle. Quand le cantilever est déplacé afin de balayer une zone de l'échantillon, sa déflexion relative nous donne une information quantitative sur la topographie de surface avec

une résolution extrêmement fine de l'ordre de quelques nanomètres (https://fr.wikipedia.org/wiki/Microscope_à_force_atomique).

Visualisation de la topographie de surface de la ganoïne en microscopie à force atomique.

Nous avons utilisé un microscope AFM en mode contact pour sonder la topographie de surface de la ganoïne des écailles du spécimen JRE.2008. La grande rigidité de la surface de la ganoïne et sa faible topographie sont en effet bien adaptées à cette technique. La déflexion du cantilever est dans ce cas directement proportionnelle aux variations de hauteur sondées. Une des limitations importantes de la technique est son champ d'observation réduit qui est limité dans notre cas à un carré d'environ une cinquantaine de microns de côté, avec l'appareil que nous avons utilisé. Une autre limitation est la nécessité de disposer d'une surface d'échantillon plane et bien horizontale.

La FIGURE 73 présente une observation de la surface de la ganoïne en microscopie à force atomique. Les microtubercules sont bien visibles et il est possible de mesurer leurs hauteurs respectives, comme le montre la FIGURE 74. Elle varie ici entre 0,2 et 0,5 micron en fonction du microtubercule considéré.

Comparaison des profils de hauteur de l'AFM avec les profils de niveaux de gris des peels

Les FIGURE 75 et FIGURE 76 comparent chez JRE.2008 les variations et les profils de hauteur des microtubercules observées en AFM avec les variations et les profils de niveaux de gris mesurés d'après les images de microscopie en contraste de phase des peels. Les mesures des profils de niveaux de gris des microtubercules ont été réalisées avec deux microscopes équipés de systèmes de contraste de phase différents, et dont l'un permet de réduire le phénomène de halo qui entoure les images.

Ces différents profils m'apparaissent très proches. En conséquence, même s'il existe probablement un très léger biais au niveau de la mesure quantitative précise des diamètres et des profils des microtubercules, qui est inhérent à la méthode de microscopie optique par contraste de phase (dû aux phénomènes de halo et de « shade off » et à la réponse non linéaire en intensité sur toute la gamme de hauteur des microtubercules), je n'en tiendrais pas compte dans mes mesures.

Par ailleurs le choix de déterminer le diamètre d'un microtubercule au tiers de sa hauteur exprimée en niveau de gris à partir d'une image de microscopie optique en contraste de phase n'est qu'une convention. Le point important est que le choix des descripteurs et de la méthode de mesure associée permette de discriminer de manière robuste différentes ornements de microtubercules. Et également que les résultats obtenus soient reproductibles indépendamment de l'expérimentateur et du microscope sur lequel a été faite la mesure.

Applications – Résultats

Je présente quelques résultats préliminaires obtenus selon ma méthode sur diverses écailles ganoïdes actuelles et fossiles.

J'ai fait évoluer et j'ai amélioré mon protocole de mesure tout au long de ce travail pour tenir compte, et m'affranchir autant que possible, des diverses limitations que j'ai pu découvrir. Cette évolution se reflète dans les résultats que je présente ci-dessous. Ils n'ont pas tous été obtenus avec strictement le même protocole opératoire. Je signalerai ces différences à l'occasion.

Etude de spécimens actuels des collections du MNHN

Premières observations avec un même seuillage pour l'ensemble des microtubercules

J'ai réalisé des peels sur les couvertures écailleuses de divers spécimens de polyptères et de lépisostées actuels, conservées à l'état sec ou bien dans des bocaux d'alcool, et dont certains proviennent de la collection d'ichtyologie du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris.

Pour mes premières déterminations quantitatives du diamètre et de la surface des microtubercules j'ai utilisé un seuillage global avec un même niveau de gris pour l'ensemble des microtubercules. Les résultats sont présentés sur les FIGURE 77 et FIGURE 78. Chaque « boîte à moustache » représente une détermination faite sur de plus de 2000 microtubercules : le trait central de la boîte à moustaches correspond à la valeur médiane mesurée et sa largeur caractérise la variabilité des mesures (les extrémités de la boîte correspondent aux quartiles Q_1 et Q_3 , et les extrémités des moustaches aux valeurs minimales et maximale).

Comme je l'ai dit précédemment, avec cette méthode de seuillage les dimensions des microtubercules les plus petits sont sous-estimées (cf. FIGURE 64), et la valeur moyenne s'en trouve affectée. De même la variabilité des mesures est artificiellement augmentée. Par ailleurs les images des peels ont été obtenues sur un champ très large incluant un grand nombre de microtubercules mais également quelques poussières et d'autres défauts topologiques qui sont également comptabilisés dans les mesures.

Néanmoins malgré les limitations inhérentes à ce premier traitement des données, et le biais qui en résulte sur les mesures quantitatives, les résultats sont comparatifs entre eux. Nous pouvons ainsi confirmer quelques résultats obtenus par Gayet et Meunier (Gayet et Meunier, 1986), et apporter des éléments nouveaux :

Confirmation de résultats déjà observés par Gayet et Meunier (Gayet et Meunier, 1986):

- Les dimensions des microtubercules (valeurs moyennes des aires ou des diamètres) sont plus importantes chez les espèces de la famille Lepisosteidae que chez celles de la famille Polypteridae, ce qui permet de les distinguer.

- Les dimensions moyennes des microtubercules sur un spécimen donné, ne semblent pas dépendre de la position anatomique de l'écaille sur le corps du poisson.

Résultats nouveaux :

- Les dimensions des microtubercules présentent sur une même écaille une variabilité notable. Cette dernière apparait plus importante chez les espèces de la famille Lepisosteidae que chez celles de la famille Polypteridae, ce qui permet de les distinguer également.
- Le spécimen JRE.2008 présente une ornementation de microtubercules qui s'apparente plus à celle de la famille Lepisosteidae qu'à celle de la famille Polypteridae.

Résultats obtenus avec le protocole de mesures finalisé.

Ces premiers résultats présentaient un biais et incluaient une variabilité additionnelle due à des défauts de surface qui étaient comptabilisés avec les microtubercules. Par contre un avantage non négligeable était le grand nombre de microtubercules pris en compte dans les mesures (> 2000).

Les résultats que je présente ci-dessous ont gagné notablement en précision, et l'inconvénient du biais lié au seuillage global a été éliminé grâce à un seuillage local fait autour de chaque microtubercule au tiers de sa hauteur exprimée en niveaux de gris. Par contre le gain en précision et en robustesse s'est fait au détriment de la représentativité des résultats. Cette dernière a notablement diminué, car le nombre de microtubercules pris en compte pour réaliser les mesures de moyenne et d'écart-type varie ici entre 350 et 500. Ce nombre est néanmoins plus de dix fois supérieur à celui utilisé par Gayet et Meunier pour l'estimation des valeurs moyennes (Gayet et Meunier, 2001).

Le matériel est constitué de deux peels montés à sec entre lame et lamelle, l'un provenant d'un spécimen de *Polypterus senegalus* référencé MNHN 2004-0184, et l'autre d'une écaille d'*Atractosteus spatula* référencée E6-Tu 383 dont l'ornementation a été étudiée au préalable par Gayet.

Deux microscopes optiques ont été utilisés afin de voir l'influence du système de contraste de phase sur les résultats :

- Un microscope Zeiss avec un objectif X20 équipé en contraste de phase positif.
- Le microscope du Centre de Microscopie de fluorescence et d'Imagerie Numérique (CeMIM) au MNHN avec un objectif X40 et un contraste de phase disposant d'un système de réduction du phénomène de halo lumineux.

Pour chaque spécimen étudié, toutes les mesures proviennent du même peel. Cinq zones différentes ont été observées (en combinant plusieurs images à différentes

profondeurs de champ) puis traitées selon notre protocole de traitement finalisé, afin d'étudier la reproductibilité de la méthode.

Trois protocoles de traitement d'une même image prise sur le microscope CeMIM, avec des « filtrages » très légèrement différents (en vue d'éliminer les défauts topologiques de la surface) ont également été réalisés afin de voir l'impact du protocole de traitement.

Comparaison des dimensions des microtubercules chez Polypterus et Atractosteus.

Les résultats obtenus pour le spécimen de *Polypterus senegalus* référencé MNHN 2004-0184 sont présentés dans le TABLEAU 5, et ceux obtenus pour le spécimen d'*Atractosteus spatula* référencé E6-Tu 383 sont présentés dans le TABLEAU 6.

Nous constatons que les valeurs moyennes des distances entre microtubercules voisins ne sont pas significativement différentes entre ces deux spécimens. Elles varient selon nos conditions de mesures entre 7,4 et 8,6 microns pour *Polypterus senegalus*, et entre 7,7 et 8,5 microns pour *Atractosteus spatula*, avec des écarts types similaires.

Les valeurs moyennes des aires ou des diamètres des microtubercules sont quant à elles significativement différentes, de même que les écarts-types associés. Si l'on compare les valeurs moyennes des « grands diamètres » (à chaque microtubercule est associée une ellipse définie par un petit et un grand diamètre) : elles varient entre 2,2 et 2,6 microns pour *Polypterus senegalus*, et entre 3,3 et 4,5 microns pour *Atractosteus spatula*. Les diamètres des microtubercules de l'espèce *Atractosteus spatula* sont approximativement deux fois plus grands que ceux de l'espèce *Polypterus senegalus*. Ce rapport est du même ordre de grandeur que celui provenant des déterminations faites par Gayet et Meunier (Gayet et Meunier, 1993). Ces auteurs avaient en effet déterminé au MEB des valeurs moyennes de diamètres de 6,25 et 2,63 microns respectivement pour *Atractosteus spatula* et *Polypterus senegalus*, soit un rapport de 2,4.

Les écarts-types associés à ces valeurs moyennes sont significativement différents pour les deux espèces. L'espèce *Atractosteus spatula* présente une variabilité (carré de l'écart type) quatre fois plus importante que l'espèce *Polypterus senegalus* au niveau des dimensions des microtubercules.

Cette variabilité importante me semble être une caractéristique du groupe « sémionotiformes + lépisostéiformes », elle est associée généralement à des microtubercules de grandes dimensions. Je ne l'ai pas observé chez les polyptéridiformes, dont les dimensions caractéristiques des microtubercules sont à la fois plus petites et également plus régulières.

Répétabilité, reproductibilité et influence de l'étape de traitement des données.

Influence du système optique du microscope.

Si l'on compare les mesures réalisées sur le microscope du CeMIM (équipé d'un objectif à contraste de phase avec un système compensateur de halo) avec celles réalisées sur le microscope Zeiss (équipé d'un système à contraste de phase « classique »), on constate que les dimensions moyennes des microtubercules sont très légèrement supérieures quand elles proviennent d'observations faites au CeMIM. Il se pourrait que le système optique utilisé influence très légèrement les résultats. Notamment le phénomène de halo lumineux entourant des objets sombres, et dont l'effet est ici inversé, pourrait conduire à une légère réduction du diamètre apparent des microtubercules en contraste de phase « classique ».

Ce point sera à prendre en considération lorsque des mesures seront réalisées dans d'autres laboratoires. Des essais croisés seront alors nécessaires pour évaluer l'impact possible des différents systèmes optiques de contraste de phase sur les mesures des dimensions des microtubercules.

Variabilité de l'ornementation et reproductibilité des mesures.

Les valeurs moyennes des diamètres ont été mesurées sur cinq zones différentes d'un même peel, avec le microscope Zeiss et selon notre protocole de traitement. Elles présentent pour les deux spécimens des écarts faibles mais néanmoins statistiquement significatifs, d'après les premiers tests statistiques que j'ai réalisés (cf. les résultats des zones 1 à 5 sur les TABLEAU 5 et TABLEAU 6).

La condition de normalité (FIGURE 87) mais aussi d'homogénéité des variances n'étant pas remplies pour les différentes régions provenant d'une même espèce, respectivement *Atractosteus spatula* ou *Polypterus senegalus*, je n'ai pas réalisé d'ANOVA.

J'ai d'abord réalisé un test préliminaire simple de comparaison de moyenne de certains échantillons pris deux à deux, adapté pour des observations de variances différentes (Test intitulé dans Excel « test d'égalité des espérances : deux observations de variances différentes »). La p-value est bien souvent, en fonction des couples d'échantillons testés au sein d'une même espèce, inférieure à 0,05. Donc au seuil de confiance de 95% l'hypothèse nulle (H_0 = les diamètres des microtubercules provenant de la zone x et de la zone y du même peel ont la même moyenne) est rejetée.

J'ai également réalisé des tests de comparaison non paramétrique de Kruskal-Wallis sur l'ensemble des zones d'un même spécimen, l'hypothèse nulle est également rejetée au seuil de confiance de 95%.

Autrement dit, quel que soit le spécimen étudié *Polypterus senegalus* ou *Atractosteus spatula*, les zones d'observation issues d'un même peel (d'environ 1 à 2 cm²) ne

constituent pas nécessairement des échantillons de microtubercules provenant statistiquement d'une même population. Les zones ne sont pas homogènes entre elles.

Certaines zones peuvent être significativement différentes entre elles au plan statistique, bien que leurs valeurs moyennes restent proches. Il convient de noter aussi que les zones sur lesquelles je réalise ces mesures ont une superficie réduite de l'ordre de 0,4 mm² alors que le peel est de 200 à 500 fois plus grand. Mes tailles d'échantillons sont-elles suffisantes pour décrire la variabilité de l'ornementation à la surface de la ganoïne ?

J'envisage deux explications possibles :

- La population de microtubercules présente une hétérogénéité spatiale notable au sein d'un peel qui se reflète au travers de la variation significative des moyennes mesurées entre les différentes zones observées. Cette hétérogénéité se reflète aussi de manière plus localisée au sein d'une zone, au niveau de la valeur de l'écart type qui est associée à la valeur moyenne. Elle serait plus grande chez l'espèce *Atractosteus spatula*.
- Les défauts topographiques présents à la surface de la ganoïne (poussières, rayures, pores, etc..) pourraient interférer avec les résultats de mes mesures malgré le soin que j'apporte au filtrage de ces défauts. La qualité de la surface est en effet souvent hétérogène, en termes de nombre de défauts topographiques présents.

D'après les quelques essais dont je dispose, les écart-types mesurés sur les moyennes issues de différentes zones, et ceux obtenus avec différents protocoles de filtrage d'une même image, sont du même ordre de grandeur.

Néanmoins des hétérogénéités locales entre « zones » existent, comme l'illustre la FIGURE 79 issue d'un peel du spécimen JRE.2008. Cette dernière montre une jonction entre deux strates de ganoïne, probablement déposées à des intervalles de temps différents. Les dimensions moyennes des microtubercules sont significativement différentes entre ces deux strates, bien que la distance les séparant soit ici très faible.

Etude de spécimens fossiles.

Comparaison des ornements chez JRE.2008 et †Macrosemmimus lennieri.

Mon objectif est ici d'étudier l'ornementation de microtubercules présente chez deux espèces fossiles proches au plan systématique, afin de vérifier dans quelle mesure ce caractère peut être utilisé pour comparer des écailles isolées.

Pour cela je vais comparer les ornements des écailles du spécimen JRE.2008 avec celles du spécimen MHNH 7267. Ce dernier est l'holotype de †*Macrosemmimus lennieri* avec lequel le spécimen que j'ai découvert présente de nombreuses affinités morphologiques.

J'ai réalisé les peels de *†Macrosemimimus lennieri* (spécimen MHNH 7267) sur place au Muséum d'Histoire Naturelle du Havre.

Les résultats sont présentés dans le TABLEAU 7. Ils ont été obtenus selon mon protocole de mesure finalisé, avec un microscope Zeiss. Pour un même spécimen, les mesures ont été réalisées sur différentes zones d'un même peel, et selon des conditions d'acquisition et de traitement des images variées. Concernant le spécimen MHNH 7267, les peels proviennent de deux écailles différentes (Im 8283 et Im 8284).

De même que pour les espèces actuelles, les mesures des aires ou des diamètres peuvent être significativement différentes sur un même peel selon les zones étudiées.

Comparons les deux moyennes issues des différentes valeurs moyennes des diamètres (major) mesurées sur les différentes zones d'observation de chacun des deux spécimens. D'après le Théorème central limite

(https://fr.wikipedia.org/wiki/Théorème_central_limite), même si une population n'est pas statistiquement normale, les valeurs moyennes de ses échantillons, s'ils sont suffisamment grands ($n > 30$), sont distribuées suivant une loi normale et peuvent être comparées avec des tests statistiques paramétriques. La table d'entrée des données et le résultat du test statistique sont présentés dans le TABLEAU 8. La p-value obtenue pour l'hypothèse nulle « les deux moyennes sont identiques » est supérieure à 0,05.

Au seuil de confiance de 95%, les deux spécimens JRE.2008 et MHNH 7267 ne sont pas statistiquement différents d'après ce critère.

Ces résultats préliminaires devront être confirmés par des mesures additionnelles et des analyses statistiques plus approfondies. Néanmoins ils sont encourageants. Ils nous indiquent que les spécimens JRE.2008 et MHNH 7267 possèdent non seulement des morphologies mais également des ornements très proches, au moins en ce qui concerne les diamètres de base des microtubercules présents à la surface de la ganoïne.

†Thaiichthys buddhabutrensis

Le spécimen référencé n° KS 12-265 de *†Thaiichthys (Lepidotes) buddhabutrensis* dont nous avons observé les peels provient de la localité de Phu Nam Jun au Nord Est de la Thaïlande (Formation Phu Kradung datant de la fin du Jurassique - début du Crétacé). Le genre *†Thaiichthys* fait partie de l'ordre des Lepisosteiformes (*sensu* Grande, 2010) au sein des Ginglymodi. Ses relations phylogénétiques ont été étudiées par L. Cavin et collaborateurs (Cavin, Deesri, & Suteethorn, 2013). La couverture écailleuse du spécimen n°KS12-265 est relativement complète, en connexion. Les peels proviennent de différents endroits anatomiques qui sont indiqués sur la FIGURE 80. Les empreintes ont été faites par U. Deesri en Thaïlande en Novembre 2010 d'après mes recommandations. J'ai observé et analysé ces peels en 2015, ce qui démontre leur capacité de conservation sur de nombreuses années.

Les premières observations qualitatives des peels réalisées en DIC (FIGURE 81) indiquent que l'ornementation de *†Thaichthys buddhabutrensis* est proche de celle de *Polypterus senegalus* alors que le premier spécimen appartient à l'ordre des Lepisosteiformes. Cette ornementation est par exemple notablement différente de celle d'une écaille isolée référencée n°A1667, récoltée dans la localité « Ban Sap Hin » au Nord Est de la Thaïlande et datant de l'Aptien (Crétacé), laquelle présente les tubercules larges et irréguliers caractéristiques de ce groupe. Un indice permet de différencier néanmoins les peels des écailles de *†Thaichthys buddhabutrensis* de ceux de *Polypterus senegalus* : il s'agit de la présence chez ce dernier d'orifices à la surface de la ganoïne provenant de nombreux canaux vasculaires. Cette caractéristique n'est pas observée chez les Holostéens.

La FIGURE 82 compare les différents peels du spécimen n° KS 12-265. Ils apparaissent tous semblables, indépendamment de leur position anatomique. Les reliefs du peel n°6, dont la position est très proche du peel n°7, sont peut-être légèrement émoussés.

Pour confirmer ces premières observations qualitatives, j'ai réalisé une étude quantitative de l'ornementation en microscopie optique par contraste de phase, selon ma méthode finalisée.

Ces résultats, issus d'un grand nombre de mesures, sont donnés dans le TABLEAU 9. Les aires et les diamètres moyens des microtubercules sont bien semblables à ceux mesurés chez les polyptères actuels (TABLEAU 5). Ils diffèrent notablement de ceux déterminés chez une espèce actuelle du genre *Atractosteus* (TABLEAU 6) ou bien chez une espèce fossile du genre *†Macrosemimimus* (TABLEAU 7).

J'ai ensuite réalisé un test statistique afin de comparer les moyennes des moyennes des grands diamètres issues de différentes zones d'observation sur *†Thaichthys buddhabutrensis* (n°265) et *Polypterus senegalus* (MNHN 2004-0184). D'après ce test, la p-value est légèrement supérieure à 0.05 et l'hypothèse nulle H_0 (les deux moyennes sont égales) est vérifiée dans le cas bilatéral.

†Thaichthys buddhabutrensis et *Polypterus senegalus* possèdent une ornementation de microtubercules dont les dimensions des grands diamètres sont statistiquement identiques au seuil de confiance de 95%. Ce résultat confirme les premières observations qualitatives.

Ce point devra être confirmé par d'autres tests statistiques, mais les autres paramètres mesurés (écart-types resserrés, valeurs des aires, des diamètres mineurs, des distances entre microtubercules, etc.) sont également proche de ceux de *Polypterus senegalus*.

La FIGURE 88 résume, sous forme de boîtes à moustaches, l'ensemble de ces premières observations.

Les spécimens *Atractosteus spatula*, *†Macrosemimimus lennieri* et le sémionotiforme indéterminé JRE.2008 forment un premier groupe dont les ornementations de

microtubercules sont très proches au niveau de la mesure des grand diamètres, tandis que *fThaichthys buddhabutrensis* et *Polypterus senegalus* forment un second groupe avec des ornements de microtubercules significativement différentes.

Je discuterai dans la partie suivante des conséquences que l'on peut déduire de ces résultats au plan phylogénétique et paléo-biologique.

Discussions – Interprétations

Intérêt en systématique

La nouvelle méthode d'étude de l'ornementation des microtubercules, mise au point par mes soins, présente un intérêt certain en systématique : c'est un bon outil de reconnaissance taxonomique par comparaison.

Elle permet en effet de faire des mesures précises, robustes et rapides, ainsi que des comparaisons validées par de tests statistiques, sur des ornements de microtubercules provenant de spécimens complets et d'écailles d'isolées.

Par ailleurs l'usage des peels nous permet d'accéder plus facilement à l'étude de l'ornementation des spécimens types conservés dans les collections.

Je confirme également les premières observations de Gayet et collaborateurs. Ce critère est peu sensible à la position anatomique des écailles. Il permet de discriminer utilement différents spécimens fossiles issus d'une même localité.

La variabilité de l'ornementation que j'ai pu observer au sein d'un peel, quel que soit le spécimen considéré, m'incite néanmoins à la prudence. Il me semble nécessaire en effet de multiplier les observations microscopiques sur différentes zones afin de disposer de résultats qui soient plus robustes au plan statistique. Je rappelle que cette ornementation est constituée de plusieurs millions de microtubercules présents seulement sur quelques centimètres carrés, et il n'est pas aisé d'en capter toute la variabilité.

De nombreux paramètres descriptifs restent encore à explorer au plan quantitatif, comme par exemple le caractère plus ou moins ellipsoïdal des microtubercules. Les microtubercules sont-ils allongés selon une direction particulière, existe-il une corrélation entre les diamètres et les distances entre voisins ?

La possibilité de générer et de traiter un nombre considérable de données bien reproductibles devrait permettre, je l'espère, de confirmer l'intérêt de ma méthode et d'en généraliser l'emploi.

Des analyses statistiques plus élaborées pourront être envisagées d'une part pour pouvoir continuer à améliorer la précision et la robustesse de la méthode de traitement (réalisation de plans d'expérience équilibrés - détection des outliers), mais aussi pour comparer plus finement les spécimens entre eux sur plusieurs critères simultanés.

Intérêt au plan paléo-biologique.

Les résultats obtenus apportent un éclairage nouveau sur la compréhension des variations de l'ornementation des microtubercules entre différents groupes. Il apparaît désormais probable que ces variations seront difficilement exploitables au plan phylogénétique.

Comment expliquer les similitudes d'ornementation entre *†Thaiichthys buddhabutrensis* et *Polypterus senegalus*, deux espèces appartenant à deux groupes très éloignés au plan phylogénétique ?

S'agirait-il d'une convergence en relation avec la fonction supposée de ces microtubercules ?

J'ai observé que l'ornementation des microtubercules ne dépendait pas ou peu de la position anatomique de l'écaille, mais qu'elle pouvait varier parfois considérablement au sein d'une même zone sur quelques centaines de microns de large, ou bien lors du dépôt des strates successives de ganoïne (FIGURE 79). Le lien entre sa variabilité et sa fonction supposée, qui est de favoriser l'accroche de l'épiderme sur les écailles en combinaison avec la membrane de la ganoïne, ne me paraît pas évident. Par ailleurs chez certaines espèces, notamment chez les lépisostées, une couche de derme s'intercale temporairement (suite à un mouvement de va et vient des cellules épidermiques à la surface de la ganoïne (Sire, 1974)) entre les écailles et l'épiderme et dans ce cas il n'y a plus de contact direct entre ces deux structures.

Les microtubercules sont-ils déjà formés dès le stade de la pré-ganoïne, ou bien apparaissent-ils plus tard au moment de sa minéralisation, ou bien lors de la formation de la membrane de la ganoïne ? Les mécanismes biologiques caractérisant leur formation ne sont malheureusement pas encore décrits.

La variabilité spatiale et temporelle (ie. d'une strate à l'autre) de cette ornementation observée principalement chez les espèces des groupes lépisostéiformes et sémionotiformes, à l'exception de *†Thaiichthys buddhabutrensis*, traduit selon moi un processus de formation de nature plus irrégulière chez ces derniers que chez les polyptères.

Fonction des tubercules

Les structures biologiques à l'échelle microscopique sont connues pour avoir souvent plusieurs fonctions (Berthier, 2016); ou bien parfois aucune fonction avérée si leur forme découle par exemple de contraintes architecturales (Gouyon *et al.*, 1997).

J'envisage ici une fonction nouvelle à cette ornementation microscopique en lien avec la fonction de protection des écailles ganoïdes qui est généralement admise (Burdak, 1986 ; Jandt, 2008 ; Yang, *et al.*, 2013).

La ganoïne est un émail multi-stratifié constitué de nombreuses strates de ganoïne d'environ une dizaine de microns d'épaisseur chacune (Meunier, 1980 ; Sire, 1995). A l'état fossile j'ai observé que cette stratification était une source de fragilité.

Les écailles peuvent en effet « délaminer » à l'interface entre les différentes couches de ganoïne par exemple à l'issue d'un choc, comme le montre la FIGURE 83 correspondant au bord brisé d'une écaille du spécimen JRE.2008. J'observe sur cette FIGURE 83 une ornementation de microtubercules qui est bien visible non seulement à la surface de l'écaille mais aussi sur une strate interne révélée par la délamination.

Le spécimen JRE.2008 présente également un phénomène localisé de dégradation de la ganoïne généré lors de la fossilisation. Il se traduit par la présence de zones plus friables et de couleur blanche au sein de cette dernière. Au niveau de ces taches, j'observe au M.E.B (FIGURE 84) un phénomène de délamination des strates de ganoïne. Sur chacune des strates dégradées on distingue encore la présence fugace des microtubercules.

Les reliefs que constituent les microtubercules sont donc présents non seulement à la surface de l'écaille mais aussi à l'interface de chacune des strates de ganoïne.

Le fait que les écailles puissent délaminer à l'interface des strates de ganoïne montre la faible cohésion de ces différentes couches sur du matériel fossile. Ce n'était certainement pas le cas du vivant de l'animal. Pour assurer une fonction de protection efficace les écailles doivent être mécaniquement résistantes. Il devait exister une structure, peut-être de nature organique, qui permette d'assurer une bonne cohésion entre les couches successives. Celle-ci a disparu ou s'est notablement dégradée lors de la fossilisation.

Je fais l'hypothèse que le système constitué par les reliefs que sont les microtubercules en association avec la membrane de la ganoïne (ou son vestige) pourrait servir le rôle d'une colle structurale et favoriser l'adhésion des différentes couches de ganoïne entre elles. La rugosité de surface est en effet un facteur connu pour améliorer l'adhésion entre deux couches au moyen d'une colle. Elle permet un meilleur ancrage mécanique et augmente la surface réelle de contact (<http://materiaux.ecam.fr/savoirplus/collage/+Collage.html>).

Plusieurs auteurs ont étudié la membrane de la ganoïne (Zylberberg *et al.*, 1985 ; Sire, 1994 ; Sire, 1995). Il s'agit d'une couche d'environ 0,5 microns d'épaisseur faite de divers protéoglycans. Ces mucosubstances lui confèrent une capacité de rétention d'eau, favorisent ses propriétés adhésives, et enfin empêchent sa minéralisation (Sire, 1995).

Après déminéralisation d'une écaille de *Lepisosteus oculatus* à l'EDTA, Sire (Sire, 1995) observe la présence de la membrane de la ganoïne à la surface de l'écaille et au niveau de la partie interne des dentelures marquant l'interface entre la lame basale osseuse et la ganoïne. Mais il ne l'observe pas au sein de cette dernière. Il en déduit que la membrane de la ganoïne a dû modifier sa composition de protéines ou son

organisation pour qu'elle puisse minéraliser lors du dépôt ultérieur d'une couche de ganoïne. Ce qui ne serait pas le cas quand un dépôt osseux vient la recouvrir.

Existerait-il une explication alternative ? L'intégrité de la membrane de la ganoïne, qui est une couche fine et de faible tenue mécanique, n'a peut-être pas résisté au traitement à l'EDTA ? Ce dernier a en effet dissout les cristaux d'hydroxyapatite de part et d'autre de cette fine membrane, et elle n'a plus eu de support matériel auquel s'accrocher au sein de la ganoïne. A contrario au niveau des dentelures elle dispose du support procuré par la matrice osseuse déminéralisée.

La connaissance de la nature exacte de l'interface entre les différentes strates de ganoïne mériterait d'être approfondie, mais elle nécessite des outils d'investigation puissants et dépasse le cadre de ce travail.

S'il existait de fines couches plus molles à l'interface des strates de ganoïne, elles pourraient participer à l'amélioration de la résistance mécanique de l'écaïlle.

La ganoïne est en effet un matériau extrêmement rigide, dont les modules de compression ou d'indentation sont de l'ordre de 50 à 60 GPa (Bruet *et al.*, 2008 ; Han *et al.*, 2011 ; Wen, *et al.*, 2013). Cet émail de par sa grande rigidité est peu résistant au choc et se fissure principalement dans le sens de l'orientation des cristaux d'hydroxyapatite (Han *et al.*, 2011).

De fines couches dont la nature serait molle, régulièrement espacées entre les strates rigides de ganoïne, ne pourraient-elles pas jouer le rôle d'un modifiant choc en dissipant l'énergie lorsqu'elles sont traversées par les fissures et en limitant leur propagation en direction des couches les plus profondes de l'écaïlle ?

La ganoïne pourrait être en quelque sorte l'analogue matériau du verre feuilleté vis-à-vis du verre ordinaire.

Ce ne sont bien évidemment que des conjectures, mais qui incitent à poursuivre les investigations sur la connaissance des relations entre la structure et les propriétés de cet émail multi-stratifié si particulier qu'est la ganoïne. Les développements de nouveaux matériaux ou de nouvelles structures s'inspirent en effet de plus en plus de l'étude des formes et des structures présentes dans la nature, qui sont si diversifiées à l'échelle micro ou nanométrique. Ils s'inspirent également de la compréhension des propriétés, des processus et des fonctions du vivant. Ces processus d'innovation émergents portent les noms de biomimétisme, bioinspiration ou encore bioingénierie (<https://fr.wikipedia.org/wiki/Biomimétisme>).

Morphogénèse

Je termine ce mémoire en présentant un travail préliminaire réalisé au tout début de mes études E.P.H.E et qui en a motivé une partie.

Il s'agit d'une réflexion sur la morphogénèse de l'ornementation des microtubercules. Cette ornementation présente en effet, sous microscope optique, des caractéristiques géométriques remarquables qui ne sont pas sans rappeler les structures issues de phénomènes d'auto-organisation connus sous le nom de Turing Patterns (Ball , 2009).

La FIGURE 85 présente l'analogie de forme qui existe entre le phénomène d'auto-organisation des constituants chimiques d'une réaction chimique oscillatoire du nom de CIMA (Ball , 2009), et l'observation de la surface de la ganoïne du spécimen JRE.2008 en microscopie optique par contraste de phase.

Ces phénomènes d'auto-organisation ont été évoqués pour tenter d'expliquer la régularité géométrique des motifs présents sur l'épiderme de nombreuses espèces animales (Murray, 1988 ; Kondo et Asai, 1995 ; Ball , 2009 ; Meinhardt, 2009),

Mes observations de microscopie optique en contraste de phase des microtubercules ne sont que la représentation dans une échelle de niveaux de gris d'un relief présent à la surface de l'écaille. Néanmoins la similitude de forme est troublante avec celle de certains "Turing Patterns" et suggère peut-être un rôle non négligeable des contraintes physiques ou physico-chimiques sur cet agencement.

Ces formes peuvent être simulées mathématiquement à partir de différents modèles théoriques. H. Meinhardt, l'auteur du livre " The algorithmic beauty of sea shells " (Meinhardt, 2009), a réalisé en 2010 des simulations de l'organisation de microtubercules à partir d'images de peels que je lui avais communiquées. Ses simulations sont présentées sur la FIGURE 86. D'après ce théoricien l'organisation en motif de points que j'observe se rapproche plus d'un modèle théorique de formation par activation-déplétion du substrat que d'un modèle par activation-inhibition dont l'agencement est plus irrégulier. Je le cite (communication personnelle, 2010) : *"The pattern suggests indeed that it is based on local self-enhancement and long range antagonistic effects. There are two pattern-forming mechanisms conceivable, an activator-inhibitor or an activator-depleted substrate model. The activated-depleted substrate mechanism leads to more regular patterns."*

Ces deux mécanismes impliquent la participation de deux effets antagonistes à l'origine du phénomène d'auto-organisation. Ils correspondent à des phénomènes "hors de l'équilibre" qui nécessitent une consommation d'énergie pour pouvoir se produire.

Bien évidemment ce ne sont que des spéculations issues de considérations théoriques et d'une simple analogie de formes. De nombreux autres mécanismes peuvent être évoqués pour tenter d'expliquer cette morphogénèse. Certains auteurs pensent par exemple que la structuration de la couche basale des cellules de l'épiderme est à l'origine des motifs observés (Schultze, 1966).

Conclusions & Perspectives

Ces travaux menés sur les écailles ganoïdes du spécimen JRE.2008 que j'ai eu l'opportunité de découvrir au pied d'une falaise argileuse du Bec de Caux m'ont permis d'aborder des domaines de recherche intéressants et variés.

- Au niveau histologique j'ai cherché à clarifier la notion de canal vasculaire de Williamson introduite par Ørvig. J'ai pu observer une structure nouvelle, faite de stries à la surface des fibres de Sharpey. Je l'attribue à un phénomène d'enroulement des fibres de collagène intrinsèques autour de ces dernières. Enfin j'ai caractérisé de manière approfondie la répartition hétérogène de la dentine à la surface des écailles, et j'ai posé quelques hypothèses sur l'origine du caractère hétérogène de cette répartition.
- J'ai mis au point une nouvelle méthode d'étude de l'ornementation des microtubercules simple, efficace et nomade. Ma méthode permet d'accéder à la détermination quantitative des dimensions d'un grand nombre de microtubercules. Elle est accessible à la fois aux professionnels et aux amateurs en paléontologie munis d'un microscope optique équipé en contraste de phase. J'ai enfin suggéré une hypothèse nouvelle quant à la fonction de ces microtubercules.

Ces divers travaux ouvrent sur des perspectives d'études nouvelles très intéressantes.

D'une part la poursuite des études histologiques avec des moyens de caractérisation complémentaires, comme par exemple la microscopie Raman confocale, afin de répondre à certaines questions restées en suspens. Comme je l'ai indiqué précédemment, le spécimen JRE.2008 est un candidat intéressant pour mieux comprendre les phénomènes évolutifs menant à la disparition de la dentine chez les *Ginglymodi* actuels.

L'étude histologique du spécimen †*Thaichthys buddhabutrensis* apparaît également intéressante à réaliser.

Concernant ma nouvelle méthode d'étude des microtubercules, elle a donné lieu à deux premières communications :

- Un premier avancement a été présenté en mars 2012 (communications affichée) lors des 5ème Rencontres de l'Ichtyologie en France (RIF 2012), organisée par la Société Française d'Ichtyologie.
- Des premiers résultats qualitatifs exploitant mes observations de peels sur des écailles fossiles ont été publiés en 2016 au sein d'un article de la revue *Cybium* : « Histology of the ganoid scales from the early Late Cretaceous of the Kem Kem

beds, SE Morocco : systematic and evolutionary implications », dont je suis co-auteur. Cet article est présenté en annexe.

J'ai l'intention de rédiger une prochaine publication, à large diffusion, afin de présenter le protocole opératoire finalisé et les résultats quantitatifs obtenus.

Ma méthode est désormais opérationnelle. Elle peut être utilisée par d'autres chercheurs. Il sera néanmoins utile de réaliser des essais croisés afin de valider sa reproductibilité dans le cadre d'un usage étendu à d'autres laboratoires équipés de microscopes dont les systèmes de contraste de phase seront peut-être différents.

Je souhaite favoriser son développement au sein de la communauté scientifique. Pour cela j'ai l'intention de réaliser de nouvelles études en collaboration avec d'autres chercheurs, et continuer à explorer ses intérêts applicatifs aux plans systématiques et paléo-biologiques.

Bibliographie.

AGASSIZ, L. (1833-1843). Recherches sur les poissons fossiles. Chapitre XIII. Du genre *Lepidotus* (Vol. 2). Neuchatel (Suisse).

BALL, P. (2009). Shapes, Nature 's Patterns: a tapestry in three parts, OXFORD University press.

BARONE-DUGENT, E., BARTY, A., NUGENT, K. (2002). Quantitative phase-amplitude microscopy I: optical microscopv. *Journal of Microscopy*, 206, 194-203.

BERCOVICI, A., HADLEY, A., VILLANUEVA-AMADOZ, U. (2009). Improving depth of field resolution for palynological photomicrography. *Palaeontologia Electronica*, 12(2), 1-12.

BERTHIER, S. (2016). Comment fait le gecko pour marcher au plafond ? A la découverte des nanostructures naturelles. BELIN - Pour la science.

BOULIGAND, Y. (2006). Cristaux liquides et morphogénèse. In "Morphogénèse, l'origine des formes", BOURGINE P., LESNE A. (Éds.), BELIN - collection Echelles, 58-95.

BRITO, P., MEUNIER, F.J., GAYET, M. (2000). The morphology and histology of the scales of the Cretaceous gar *Obaichthys* (Actinopterygii, Lepisosteidae) : phylogenetic implications. *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, 331, 823-829.

BROMAGE, T., GOLDMAN, H., McFARLIN, S., BOYDE, A., RIGGS, C. (2003). Circular polarized light standards for investigations of collagen fibers orientation in bones. *The anatomical record (Part. B: New Anat.)*, 247B, 157-168.

BRUET, B., SONG, J., BOYCE, M., ORTIZ, C. (2008). Materials design principles of ancient fish armour. *Nature materials*, 7, 548-756.

BURDAK, V. (1986). Morphologie fonctionnelle du tegument écailleux des poissons. *Cybiurn*, 10(3), 99-122.

CASTANET, J. (1979). Données comparatives sur la minéralisation des marques de croissance squelettique chez les Vertébrés. Etude par microradiographie quantitative. *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, 289, 405-408.

CASTANET, J. (1981). Nouvelles données sur les lignes cimentantes de l'os. *Archives de Biologie (Bruxelles)*, 92, 1-24.

CASTANET, J., MEUNIER, F.J., DE RICQLES, A. (1977). L'enregistrement de la croissance cyclique par le tissu osseux chez les vertébrés poïkilothermes : données comparatives et essai de synthèse. *Bulletin Biologique de la France et de la Belgique*, 111(2), 183-202.

CAVIN, L. (2010). Diversity of Mesozoic semionotiform fishes and the origin of gars (Lepisosteidae). *Naturwiss*, 97(12), 1035-1040.

CAVIN, L., DEESRI, U., SUTEETHORN, V. (2013). Osteology and relationships of Thai-ichthys nov.gen.: a ginglymodi from the late jurassic-early cretaceous of Thailand. *Palaeontology*, 56(Part. 1), 183-208.

CAVIN, L., SUTEETHORN, V., KHANSUBHA, S., BUFFETAUT, E., TONG, H. (2003). A new Semionotid (Actinopterygii, Neopterygii) from the Late Jurassic-Early Cretaceous of Thailand. *Comptes-Rendus Palevol*, 2, 291-297.

DAGET, J., GAYET, M., MEUNIER, F.J., SIRE, J.-Y. (2001). Major discoveries on the dermal skeleton of fossil and recent polypteriformes: a review. *Fish and Fisheries*, 2, 113-124.

DONOGUHE, P.C.J. (2002). Evolution of development of the vertebrate dermal and oral skeletons: unraveling concepts, regulatory theories, and homologies. *Paleobiology*, 28(4), 474-507.

DUTRA, M.F.A., MALABARBA, M.C.S.L. (2001). Peixes do Albiano-Cenomaniano do Grupo Itapecuru no estado do Maranhao, Brasil. In " O. Cretaceo na Bucia de SaoLui-Grajau", ROSSET.D., GOEAS A., TRUCKENBROSTW (Éds.), 191-208.

ERMIN, R., RAU, R., REIDEBANZ, H. (1971). Der submikroskopische Aufbau der Ganoïdschuppen von Polypterus in Vergleich zu den Zahngeweben der Säugetiere. *Biomineralisation*, 3, 12-21.

ESIN, D. (1995). Ontogenetic development of the squamation in some Palaeoniscoid fishes. *Bulletin Muséum National Histoire Naturelle*, 17(Section C, n°1-4), 227-234.

FRANCILLON-VIEILLOT, H., DE BUFFRENIL, V., CASTANET, J., GERAUDIE, J., MEUNIER, F. J., SIRE, J.-Y., DE RICQLES, A. (1990). Microstructure and mineralization of Vertebrate skeletal tissues. In "Skeletal biomineralization: patterns, processes and evolutionary trends", C. J.G. (Éd.) New-York: Van Nostrand Reinhold, 1, 475-530.

FÜSUN, A., FÜSUN, Ö., SEMA, B., SOLEN, K. (2005). Acetate peel technique: a rapid way of preparing sequential surface replica of dental hard tissues for microscopic examination. *Archives of Oral Biology*, 50, 837-842.

GAYET, M., MEUNIER, F.J. (1986). Apport de l'étude de l'ornementation microscopique de la ganoïne dans la détermination de l'appartenance générique et/ou spécifique des écailles isolées. *Comptes-Rendus Académie Sciences de Paris*, t.303, Série II, n°13, 1259-1262.

GAYET, M., MEUNIER, F.J. (1992). Polypteriformes (Pisces, Cladistia) du Maastrichtien et du Paléocène de Bolivie. *Geobios*, 14, 159-168.

- GAYET, M., MEUNIER, F. (1993). Conséquences paléobiogéographiques et biostratigraphiques de l'identification d'écailles ganoïdes du Crétacé supérieur et du Tertiaire inférieur d'Amérique du Sud. *Document Laboratoire Géologique Lyon*, 125, 169-185.
- GAYET, M., MEUNIER, F.J. (2001). A propos du genre *paralepidosteus* (Ginglymodi, Lepisosteidae) du cretace Gondwanien. *Cymbium*, 25(2), 153-159.
- GAYET, M., MEUNIER, F.J., LEVRAT-CALVIAC, V. (1988). Mise en évidence des plus anciens Polypteridae dans le gisement sénonien, d'In Becetem (Niger). *Comptes-Rendus Académie Sciences de Paris*, t.307, Série II, 205-210.
- GAYET, M., MEUNIER, F.J., WERNER, C. (2002). Diversification in polypteriformes and special comparison with the lepisosteiformes. *Paleontology*, Vol. 45, Part 2, 361-376.
- GIRAUD-GUILLE, M.-M., BELAMIE, E., MOSSER, G. (2003). Organic and mineral networks in carapaces, bones and biomimetic materials. *Comptes Rendus Palevol*, 3, 503-513.
- GOODRICH, E. (1907). On the scales of fish, living and extinct, and their importance in classification. *Proceedings Zoological Society London*, 751-774.
- GOUYON, P.-H., HENRY, J.-P., ARNOULD, J. (1997). Jeu des possibles, jeu des contraintes (chapitre 7). In "Les avatars du gène", Belin -Pour La Science (Éd.), 279-304.
- GRANDE, L. (2010). An empirical synthetic study of gars (Lepisosteiformes) and closely related species, based mostly on skeletal anatomy. The Resurrection of Holostei. (Vol. Copeia, Spec. Publ.,6).
- HAN, L., WANG, L., SONG, J., BOYCE, M., ORTIZ, C. (2011). Direct quantification of the mechanical anisotropy and fracture of an individual exoskeleton layer via uniaxial compression of micropillars. *Nanoletters*, 11, 3868-3874.
- HONJO, S., FISCHER, A. (1965). Thin sections and peels for high-magnification study and phase-contrast microscopy. In "Handbook of paleontological techniques", RAUP B. K. (Éd.), 241-247.
- JAIN, S., ROBINSON, P. L. (1963). Some new specimens of the fossil fish *Lepidotes* from the English upper Jurassic. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 141, 119-135.
- JANDT, K. (2008). Fishing for compliance. *Nature Materials*, 7, 692-693.
- JONES, S., BOYDE, A. (1974). The organization and gross mineralization patterns of the collagen fibres in Sharpey fibre bone. *Cell Tiss. Res.*, 148, 83-96.

- KERR, T. (1952). The scales of primitive living actinopterygians. *Proceedings Zoological Society London*, 122(1), 55-78.
- KOMAGATE, K., SUZUKI, A., KUWABARA, R. (1993). Sexual dimorphism in the polypterid fishes *Polypterus senegalus* and *Calamoichthys calabaricus*. *Japanese journal of Ichthyology*, 39(4).
- KONDO, S., ASAI, R. (1995). A reaction-diffusion wave on the skin of the marine fish angelfish *Pomacanthus*. *Nature*, 376, 765-768.
- KONDO, S., IWASHITA, M., YAMAGUCHI, M. (2009). How animals get their skin patterns: fish pigment pattern as a live Turing wave. *The international journal of developmental biology*, 851-856.
- LIEBERMAN, D. (1994). The biological basis for seasonal increments in dental cementum and their application to archeological research. *Journal of Archaeological Science*, 21, 525-539.
- LOPEZ-ARBARELLO, A. (2012). Phylogenetic Interrelationships of Ginglymodian Fishes (Actinopterygii: Neopterygii). *PLoS ONE*, e39370.
- MEINHARDT, H. (2009). The algorithmic beauty of sea shells, fourth edition, SPRINGER, Éd.
- MEUNIER, F.J. (1980). Recherches histologiques sur le squelette dermique des Polypteridae. *Archives de Zoologie Expérimentale & Générale*, 122(4), 279-295.
- MEUNIER, F.J. (1984). Spatial organization and mineralization of the basla plate of elasmoid scales in osteichthyans. *American Zoologist*, 24, 953-964.
- Meunier, F.J. (1987). Os cellulaire, os acellulaire et tissus dérivés chez les Ostéichthyens: les phénomènes de l'acellularisation et la perte de minéralisation. *Ann. Biol.*, 26, 201-203.
- MEUNIER, F.J. (2011). The osteichthyes from the paleozoic to the extant time through histology and palaeohistology of bony tissues. *Comptes Rendus Palevol*, 10, 347-355.
- MEUNIER, F.J. (2011). The osteichthyes, from the Paleozoic to the extant time, through histology and palaeohistology of bony tissues. *Comptes Rendus Palevol*, 10, 347-355.
- MEUNIER, F.J. (2002). Différents types de pièces calcifiées B. Ecailles C. Squelette. In "Manuel de Sérochronologie des poissons", PANFILI J., DE PONTUAL H., TROADEC H., WRIGHT P. (Éds.), 58-87.

- MEUNIER, F.J., GAYET, M. (1996). A new polyptériform from the late Cretaceous and the middle Paleocene of South America. In "Mesozoic Fishes - Systematics and Paleocology", VIOHL G. A., Éd., 95-103.
- MEUNIER, F. J., GAYET, M., GERAUDIE, J., SIRE, J.-Y., ZYLBERBERG, L. (1987). Données ultrastructurales sur la ganoïne du dermosquelette des actinoptérygiens primitifs. In "Proc VIIth Intern Symposium Dental Morphology", RUSSEL D.E., SANTORO J.P., SIGOGNEAU-RUSSEL D. (Éds.), *Mémoires du Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, Série C*, 53, 77-83.
- MEUNIER, F.J., BRITO, P. (2004). Histology and morphology of the scales in some extinct and extant teleost. *Cybium*, 28(3), 225-235.
- MEUNIER, F.J., FRANCOIS, Y. (1992). La croissance du squelette chez les Téléostéens 1.- Squelette, os, tissus squelettiques. *L'Année Biologique*, 31(4), 169-184.
- MEUNIER, F.J., DESCHAMP, M.-H., LECOMTE, F., KACEM, A. (2008). Le squelette des poissons téléostéens : structure, développement, physiologie, pathologie. *Bulletin de la Société zoologique de France*, 133 (1-3), 9-32.
- MEUNIER, F.J., EUSTACHE, R.-P., DUTHEIL, D., CAVIN, L. (2016). Histology of the ganoid scales from the early Late Cretaceous of the Kem Kem beds, SE Morocco: systematic and evolutionary implications. *Cymbium*, 40(2), 121-132
- MURRAY, J. (1988). Mammalian coat patterns: how the leopard gets its spots. *Scientific American*, 256, 80-87.
- ØRVIG, T. (1951). Histologic studies of Placoderms and fossil Elasmobranchs. 1.-The endoskeleton with remarks on the hard tissues of lower vertebrates in general. *Arkiv för Zoology*, 321-454.
- ØRVIG, T. (1956). Remarks on the vertebrate fauna of the Lower Upper Devonian of Escuminac Bay, P.Q., Canada, with special reference to the Porolepiform Crossopterygians. *Arkiv för Zoologi*, 10(6), 367-426.
- ØRVIG, T. (1957). Paleohistological notes. 1. On the structure of the bone tissue in the scales of certain Palaeonisciformes. *Arkiv för Zoologi*, 10(12), 481-490.
- ØRVIG, T. (1966). Histologic studies of Ostracoderms, Placoderms and fossil Elasmobranchs. 2. On the dermal skeleton of two late Palaeozoic Elasmobranchs. *Arkiv för Zoologi*, 19(1), 1-39.
- ØRVIG, T. (1977). A survey of odontodes ("dermal teeth") from developmental, structural, functional, and phyletic points of view. In "Problems in Vertebrate Evolution", ANDREWS S.M., MILES R., WALKER A. (Éds.), Linn. Soc. Symp. Ser., 4, 53-75.

ØRVIG, T. (1978a). Microstructure and growth of the dermal skeleon in fossil actinopterygian fishes: *Birgeria* and *Scanilepis*. *Zoologica Scripta*, 7, 33-56.

ØRVIG, T. (1978b). Microstructure and Growth of the Dermal Skeleton in Fossil Actinopterygian Fishes: *Boreosomus*, *Plegmolepis* and *Gyrolepis*. *Zoologica Scripta*, 7, 125-144.

QU, Q., SANCHEZ, S., BLOM, H., TAFFOREAU, P., AHLBERG, P. (2013). Scales and Tooth Whorls of Ancient Fishes Challenge Distinction between External and Oral "Teeth". *PLoS ONE* 8(8) : e71890, 8(8): e71890.

SAMSON, Y. (1997). Utilisation des foraminifères dans l'estimation des variations bathymétriques des environnements de dépôts marins jurassiques : application au kimmeridgien de l'ouest-européen. Thèse de l'université Paris 6.

SAMSON, Y., LEPAGE, G., HANTZPERGUE, P., GUYADER, J., SAINT-GERMES, M., BAUDIN, F., BIGNOT, G. (1996). Révision lithostratigraphique et biostratigraphique du Kimmeridgien de la région havraise (Normandie). *Géologie de la France*, 3-19.

SAUVAGE, H. (1893). Description de deux espèces nouvelles de poissons du kimmeridgien du Cap de la Hève. *Bulletin de la Société Géologique de Normandie*, 14, 3-7.

SCHAEFFER, B. (1977). The dermal skeleton in fishes. In "Problems in Vertebrate Evolution", ANDREWS S.M., MILES R., WALKER A. (Éds.), Vol. *Linnean Society Symposium Series*, 25-52.

SCHRÖDER, K., LOPEZ-ARBARELLO, A., EBERT, M. (2012). *Macrosemimimus*, Gen. Nov. (Actinopterygii, Semionotiformes), from the late Jurassic of Germany, England, and France. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 32(3), 512-529.

SCHULTZE, H.-P. (1966). Morphologissche und histologische Untersuchungen an Scuppen mesozoischer Actinopterygier (Übergang von Ganoid-zu Rundschuppen). *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie*, 126, 232-314.

SCHULTZE, H.-P. (1977). Ausgangsform und Entwicklung der rhombische Schuppen der Osteichthyes (Pisces). *Paläontologische Zeitschrift*, 51, n°3/4, 152-168.

SCHULTZE, H.-P. (1996). The scales of Mesozoic actinopterygiens. In "*Mesozoic Fishes - Systematics and Paleoecology*", ARRATIA G., & VIOHL G. (Éds.), 83-93.

SCHWEITZER, M. H., AVCI, R., COLLIER, T., GOODWIN, M. (2008). Microscopic, chemical and molecular methods for examining fossil preservation. *Comptes Rendus Palevol*, 7, 159-184.

- SCHWEITZER, M. H., WITTMAYER, J., HORNER, J. (2007). Soft tissue and cellular preservation in vertebrate skeletal elements from the Cretaceous to the present. *Proceedings of the Royal Society B*, 274, 183-197.
- SIRE, J.-Y. (1989). Scales in young *Polypterus senegalus* are elasmoid: new phylogenetic implications. *The American Journal of Anatomy*, 186, 315-323.
- SIRE, J.-Y. (1990). From Ganoid to Elasmoid scales in the Actinopterygians fishes. *Netherlands Journal of Zoology*, 40, 75-92.
- SIRE, J.-Y. (1994). Light and TEM Study of Nonregenerated and Experimentally Regenerated Scales of *Lepisosteus oculatus* (Holostei) With Particular Attention to Ganoine Formation. *The Anatomical Record*, 240, 189-207.
- SIRE, J.-Y. (1995). Ganoine formation in the scales of primitive actinopterygian fishes, Lepisosteids and Polypterids. *Connective Tissue Research*, 33(1-3), 213-222.
- SIRE, J.-Y., MEUNIER, F.J. (1994). The *Canaliculi* of Williamson in Holostean Bone (Osteichthyes, Actinopterygii): a Structural and Ultrastructural Study. *Acta Zoologica*, 75(3), 235-247.
- SIRE, J.-Y., DONOGHUE, P. C.J., VICKARYOUS, M. K. (2009). Origin and evolution of the integumentary skeleton in non-tetrapod vertebrate. *Journal of Anatomy*, 214, 409-440.
- SMITH, J. B., GRANDSTAFF, B. S., ABDEL-GHANI, M. S. (2006). Microstructure of polypterid scales (osteichthyes: actinopterygii: polypteridae) from the upper cretaceous Baharia formation, Baharya oasis, Egypt. *J. Paleont.*, 1179-1185.
- STEWART, W., TAYLOR, T. (1965). The peel Technique. In "*Handbook of paleontological techniques*", RAUP B.K. (Éd.), 224-232.
- SUBIT, D. (2004). Modélisation de la liaison os-ligament dans l'articulation du genou. Thèse de Doctorat Université de la Méditerranée (Aix- Marseille II), 174p.
- SULTAN, R.F., ABDEL-RAHMAN M. A-F. (2013). On dynamic self-organization: examples from magmatic and other geochemical systems. *Latin American journal of Solids and Structures*, 10, 59-73.
- THOMSON, K. S., & McCUNE, A. R. (1984a). Scale structure as evidence of growth patterns in fossil semionotid fishes. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 4(3), 422-429.
- THOMSON, K.S., McCUNE, A.R. (1984b). Development of the scales in *Lepisosteus* as a model for scale formation in fossil fishes. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 82, 73-86.

- TRINAJSTIC, K. (1999). Scales of the paleoniscoid fishes (Osteichthyes : Actinopterygii) from the late Devonian of Western Australia. *Records of the Western Australian museum*, 57, 93-106.
- WEN, Y., GLUDOVATZ, B., ZIMMERMANN, E., BALE, H., RITCHIE, R., MEYERS, M. (2013). Structure and fracture resistance of alligator gar (*Atractosteus spatula*) armored fish scale. *Acta Biomaterialia*, 9, 5876-5889.
- WENZ, S. (1968). Compléments à l'étude des poissons actinoptérygiens du Jurassique français. Cahiers de Paléontologie, Paris (CNRS), 81-108.
- WILLIAMSON, W.C. (1849). On the microscopic structure of the scales and dermal teeth of some ganoid and placoid fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 139, 435-475.
- WOODWARD, A. (1895). Catalogue of the fossil fishes in the British Museum part 3. London: British Museum (Natural History), 545p.
- YANG, W., CHEN, I., GLUDOVATZ, B., ZIMMERMANN, E., RITCHIE, R., MEYERS, M. (2013). Natural flexible dermal armor. *Advanced Materials*, 25, 31-48.
- ZYLBERBERG, L., MEUNIER, F.J. (2013). Histology of *Polypterus senegalus* fin rays revisited. *Comptes Rendus Palevol*, 203-210.
- ZYLBERBERG, L., GERAUDIE, J., SIRE, J.-Y., MEUNIER, F.J. (1985). Mise en évidence ultrastructurale d'une couche organique entre l'épiderme et la ganoïne du dermosquellette des Polypteridae, *Comptes-Rendus Académie Sciences de Paris*, t.301, Série III (n°10), 517-522.

Liste des Figures

Figure 1 : Vu éclatée des os du toit crânien (Fr : frontal ; Pa : pariétal ; e : écaille ; ptt : posttemporal ; ex : extrascapulaire ; dsph : dermosphénotique ; dpt : dermoptérotique ; so : sousorbital)	100
Figure 2 : Mise en connexion anatomique des os du toit crânien. Echelle : petits carrés verts de 1cm de côté.....	101
Figure 3 : vue éclatée des os de la joue (op : opercule ; sop : sousopercule ; pop : préopercule, scl : suprachleitrum).....	102
Figure 4 : connexion anatomique entre l'opercule et le sous-opercule (cf. légende de la Figure 3).....	103
Figure 5 : fragments de la dentition. La couronne des dents est située au sommet d'un pédicule et présente au niveau de l'apex une petite pointe plus ou moins émoussée. La base des dents est plus ou moins ovale. Les dents marginales sont nettement plus petites que les dents internes et leurs pointes sont moins émoussées (vo : vomer)	104
Figure 6 : Ecaïlles des flancs. Elles possèdent deux processus articulaires marqués orientés selon l'axe antéro-postérieur. Ils sont situés aux bords antéroventral et antérodorsal. Les écaïlles de gauche n'ont pas d'articulation « peg and socket » contrairement aux écaïlles de droite, qui présentent également un processus articulaire selon l'axe dorsoventral. Echelle : petits carrés verts de 1cm de côté.	104
Figure 7 : Les écaïlles de gauche, très épaisses, ont les processus antéroventral et antérodorsal inclinés dorsalement. Elles proviennent de la région ventrale. Les écaïlles de droite n'ont pas de processus articulaire marqué. Echelle : petits carrés verts de 1cm de côté.	105
Figure 8 : Différentes écaïlles de symétrie axiale ou proche. Les écaïlles de droite présente une pointe sur leur partie postérieure et sont situées au niveau la ligne dorsale. Echelle : petits carrés verts de 1cm de côté.	105
Figure 9 : Comparaison des dimensions des opercules et sous opercules. A gauche le spécimen †M. lennieri du Kimméridgien d'Angleterre, au centre le spécimen JRE.2008 du Kimméridgien du Havre, à droite le spécimen †L. leedsi.	106
Figure 10 : Comparaison du toit crânien avec ceux de †M. lennieri et †L. leedsi.	106
Figure 11 : Canaux vasculaires de Williamson (ou canaliculus de Williamson de type II) chez †Histonotus angularis, d'après (Schultze, 1966).	107
Figure 12 : Spécimen JRE.2008. Observation en D.I.C. Absence locale de dentine entre l'os pseudo-lamellaire et la ganoïne. Deux canaliculi de Williamson dont l'un traverse les strates de ganoïne.	107
Figure 13 : Lepidotes JRE.2008. Observation en D.I.C. Présence locale de dentine entre l'os pseudo-lamellaire et la ganoïne.	108
Figure 14 : Spécimen JRE.2008. Observations en D.I.C. Unités de dentine avec lignes de résorption (flèches blanches : lacunes de Howship) et cavité vasculaire (étoile blanche).	108
Figure 15 : Lepidotes JRE.2008. Observation en D.I.C. Canaliculi de Williamson traversant la lame basale presque perpendiculairement aux lignes d'accroissement de l'écaille, les flèches indiquent les extrémités caractéristiques en plumet des canaliculi.	109
Figure 16 : Lepidotes JRE.2008. Observation en champ clair. Canaliculus de Williamson de type II de 3 à 5 microns d'épaisseur, présentant des ramifications, et dont les extrémités sont en connexion avec différents incréments de dentine.	109
Figure 17 : Lepidotes JRE.2008. Observation en D.I.C. Extrémité d'un canaliculus de Williamson de type II situé dans la dentine.....	110
Figure 18 : Lepidotes JRE.2008. Observation en D.I.C. Présence d'un canaliculus de Williamson de type II sur la gauche et d'un canaliculus de Williamson sur la droite (flèches jaune). Les extrémités du canaliculus de Williamson de type II prennent naissance dans la dentine à proximité des canaliculi odontoblastiques (flèches rouge). Cette dernière est peu développée en épaisseur.	111

Figure 19 : Lepidotes JRE.2008. Observation en D.I.C. Extrémités d'un canaliculus de Williamson de type II dans deux unités de dentine adjacentes. Un ostéocyte est également à proximité	112
Figure 20 : Lepidotes JRE.2008. Observation en champ clair. Coupe tangentielle à la surface. Observation des ostéocytes et des connexions entre voisins.	112
Figure 21 : Lepidotes JRE.2008. Observation en champ clair. Fibres de Sharpey (flèches). Les rectangles rouges correspondent à des régions où la diagénèse modifie le contraste de couleur noire des fibres de Sharpey.	113
Figure 22 : Lepidotes JRE.2008. Observation de la surface au MEB. Observation d'un canal vasculaire (flèche orange) et de canaliculi de Williamson (flèches rouges) dans la lame basale.	114
Figure 23 : Observation au M.E.B. Localisation des analyses EDX réalisées sur un canaliculus de Williamson orienté verticalement et un capillaire vasculaire orienté horizontalement.	115
Figure 24 : Analyse EDX des canaliculi de Williamson et de canaux vasculaires localisés sur la Figure 23 : le pic du carbone est très important vis-à-vis des autres éléments comme le phosphore ou le calcium. .	116
Figure 25 : Ganoïne et plaque basale observée en microscopie électronique à balayage. Les pointages correspondent aux endroits où ont été réalisées les analyses élémentaires.	117
Figure 26 : analyse EDX de la ganoïne de la Figure 25 : absence de fluor, le pic du carbone est très faible (il s'agit ici d'une métallisation au carbone de la surface d'une épaisseur de 20 nm. La profondeur d'observation en analyse élémentaire est de l'ordre du micron.	118
Figure 27 : Analyse EDX de la lame basale de la Figure 25 : présence notable de fluor. L'intensité du pic du carbone est nettement plus importante qu'au sein de la ganoïne (cf. Figure 26).	119
Figure 28 : Ecaille de †Scanilepis dubia. Odontocomplexe, constitué d'unités de dentine adjacentes séparées par des lignes de résorption (d'après Ørvig, 1978a).	120
Figure 29 : Lepidotes JRE.2008. Initium. Canaliculus de Williamson présentant deux branches (tête de flèche), et dont l'extrémité (flèche) est à proximité de l'initium. G : Ganoïne; D : Dentine, O : Os. , Os : ostéocytes. La partie osseuse juste sous la dentine semble faite d'os fibreux d'après la forme étoilée de l'ostéocyte situé en haut et à gauche de l'image, puis elle devient rapidement pseudo-lamellaire avec des ostéocytes (en bas à gauche) orientés dans le sens des fibrilles de collagène.	121
Figure 30 : Lepidotes JRE.2008. Coupe tangentielle à la surface de l'écaille et traversant les couches d'os et de dentine. Rectangle : jonction entre l'extrémité en plumet d'un canaliculus de Williamson et un ostéocyte. Tête de flèche : branchement au niveau d'un canalicule. Flèche : extrémité d'un canaliculus de Williamson de type II en connexion avec la dentine.	122
Figure 31 : Agrandissement de la figure 19. Canaliculi odontoblastiques de la dentine (flèche bleue) et lacunes de Howship (têtes de flèches rouges).	123
Figure 32 : Détail d'un odontode : canaliculus de Williamson issu d'un canal vasculaire (étoile orange) et dont les ramifications (flèches rouges) sont en connexion avec la dentine. La ligne orange marque l'interface entre la matrice osseuse et la dentine	124
Figure 33 : Comparaison de deux odontodes. Dans celui de gauche on observe la cavité pulpaire tandis que dans l'odontode de droite cette dernière a été comblée par de la substance osseuse, et notamment l'interface avec la dentine (ligne orange). Quelques cavités vasculaires sont visibles. Le carré rouge correspond à la zone visualisée sur la Figure 32.	124
Figure 34 : Lepidotes JRE.2008. Détail de l'initium de la Figure 29. Succession d'une couche de dentine de 10 à 15 microns, puis d'os fibreux de 30 à 40 microns, puis d'os pseudo-lamellaire. Un canal vasculaire (Cv.) ainsi qu'un ostéocyte (Os.) sont visibles dans la couche d'os fibreux, ainsi que des extrémités de canaliculi de Williamson (flèches bleues)	125
Figure 35 : Coupe longitudinale, du bord antérieur au bord postérieur, et passant par l'initium.	126
Figure 36 : Coupe transversale, du bord dorsal au bord ventral, et passant par l'initium.	126
Figure 37 : Lepidotes JRE.2008. Coupe transversale près du bord postérieur de l'écaille. La partie ventrale est à gauche de l'image.	126

Figure 38 : Lepidotes JRE.2008. Petit os dermique avec 6 odontodes	127
Figure 39 : représentation schématique de la localisation de la dentine. Les rectangles orange correspondent à la localisation de la dentine sur une coupe longitudinale et une coupe transversale passant par l'initium. Les deux ovales orange correspondent à la localisation de la dentine faite sur la coupe transversale figurée, qui a été réalisée selon la ligne rouge près du bord postérieur de l'écaille...	128
Figure 40 : Ecaillure de lépisostée recouvert de sa couche d'épiderme. Bord postérieur à droite et bord dorsal en haut. Pour chaque écaille les bords postérieur et ventral sont recouvrant, tandis que les bords antérieur et dorsal sont recouverts par les écailles adjacentes (dessin d'après (Francillon-Vieillot, et al., 1990)).....	129
Figure 41 : Ornementation caractéristique d' <i>†Obaichthys decoratus</i> (illustrations d'après (Grande, 2010)). Les crêtes sont alignées longitudinalement indépendamment de la forme des diverses écailles auxquelles elles appartiennent.	129
Figure 42 : Fibres de Sharpey en lumière transmise. Trois régions distinctes : région C où les fibres sont noires et ondulantes, région A où elles sont translucides et ondulantes, région B où elles ne sont pas apparentes.....	130
Figure 43 : Agrandissement de la région gauche de la Figure 42. Image en contraste interférentiel sous nicols croisés (D.I.C). Dans la région B les fibres de Sharpey minéralisées sont présentes sous la forme de bandes blanches striées d'environ 3 microns de large (étoiles) à cause de leur biréfringence.	131
Figure 44 : Image composite réalisée à l'aide du logiciel ImageJ : superposition d'une image en lumière transmise et d'une image en D.I.C. Les fibres de Sharpey dans les régions B, présentes sous la forme de stries blanches apparaissent dans la continuité des fibres noires ondulantes de la région C, et également dans la continuité des fibres translucides de la région A.	132
Figure 45 : Fibres de Sharpey en contraste interférentiel sous nicols croisés (D.I.C) à gauche, et en lumière naturelle à droite (champ clair). La flèche bleue correspond à l'emplacement d'une fibre de Sharpey "invisible" en lumière naturelle, mais présente sous la forme d'une bande blanche en lumière polarisée-analysée à cause de sa biréfringence. L'étoile correspond à un canaliculus de Williamson.....	132
Figure 46 : Observation en DIC. Agrandissement de la Figure 45, afin de distinguer la structure fine présente sur les fibres de Sharpey minéralisées, consistant en des stries perpendiculaires à l'axe des fibres et distantes d'un micron environ.	133
Figure 47 : Observation en DIC. Présence de fines fibrilles noires au sein des fibres de Sharpey partiellement minéralisées (flèches bleues).	133
Figure 48 : Phénomène physico chimique de précipitations périodiques connu sous le nom de « Liesegang bands », figure d'après (Sultan, 2013).	134
Figure 49 : Observation en DIC. Variation de la périodicité des stries sur une même fibre de Sharpey minéralisée selon les zones observées.	134
Figure 50 : Observation en DIC. Les stries sont toujours perpendiculaires à l'axe des fibres de Sharpey, indépendamment de la direction générale des fibres intrinsèques environnantes, indiquées par la double flèche blanche.....	135
Figure 51 : Observation en DIC. Il semble exister une continuité entre les stries sur les fibres de Sharpey minéralisées et les fibres intrinsèques adjacentes.....	136
Figure 52 : Observation au MET –Thèse Damien SUBIT de 2004. Enroulement des fibrilles de collagène (flèches rouges) autour d'amas (*) qui correspondent à des paquets de fibrilles de collagène, donc à des fibres de collagène orthogonales coupées transversalement.	137
Figure 53 : Thèse de >Damien Subit. Hypothèse d'un mécanisme d'attache des fibres orthogonales.	137
Figure 54 : Image composite, superposition d'une observation en lumière naturelle et en D.I.C sous analyseur et polariseur croisés. Changement d'orientation des fibres de Sharpey entre les régions où elles ne sont pas minéralisées (fibres noires) et les régions où elles sont minéralisées (fibres blanches).....	138
Figure 55 : Apposition du caractère "dentine" (carrés jaunes) sur la phylogénie de Lopez-Arbarelló (Lopez-Arbarelló, 2012) au sein de la famille des Ginglymodi.	139

Figure 56 : Peel en cour de séchage sur la couverture écailleuse d'un lépisostée actuel conservé dans de l'alcool	140
Figure 57 : observation d'un peel de <i>Polypterus ornatipinnis</i> au grossissement x20 en contraste interférentiel (M.O.)	141
Figure 58 : Peel d' <i>Erpetoichthys callabaricus</i> observé en contraste de phase selon Zernike	142
Figure 59 : Peel d' <i>Erpetoichthys callabaricus</i> , utilisation d'une piles d'images réalisées avec différentes mises au point et de la macro stack focuser pour améliorer la netteté sur tout le champ d'observation correspondant à l'image de la Figure 58.	143
Figure 60 : Mesure manuelle des diamètres (double flèche rouge) et distances (double flèche bleue) entre microtubercules en accord avec les déterminations de Gayet (1) et selon les nouveaux descripteurs que nous proposons pour le traitement semi-automatisé des images (2).....	143
Figure 61 : L'image de gauche a été prise avec un temps d'acquisition de 50ms, tandis que l'image de droite a été prise avec un temps d'acquisition de 150ms. Bien que les valeurs absolues de niveaux de gris soient différentes, les proportions sont conservées au niveau des profils d'intensité caractérisant les microtubercules sur ces deux images.	144
Figure 62 : Image (1) prise avec une mise au point correcte et image (2) où la mise au point a été réalisée à un autre endroit du peel. Les diamètres des tubercules sont artificiellement élargis quand la mise au point n'est pas correcte.	145
Figure 63 : Image (3) correspond à une image composite issue d'une pile d'images réalisées avec différentes mises au point selon Z et traitées avec le plugin « stack focuser ». Les profils d'intensité et les diamètres des tubercules de l'image (3) correspondent à ceux de l'image (1) où la mise au point a été faite localement.	146
Figure 64 : Microtubercules seuillés de manière globale avec le même niveau de gris donné, ou bien de manière locale avec un niveau de gris adapté pour chaque tubercule et correspondant au tiers de l'intensité lumineuse de son maximum	146
Figure 65 : Différentes étapes de mesure semi-automatique des diamètres et distances entre microtubercules. Etape 1 : pavage de Voronoï autour de chaque microtubercule. Etape 2 : Seuillage local de chaque tubercule et mesure de son diamètre. Etape 3 : calcul du plus proche voisin de chaque tubercule et mesure des distances entre les centres des plus proches voisins.....	147
Figure 66 : traitement selon mon protocole d'un plus grand champ d'observation. Sont comptabilisés de manière automatique les dimensions et distances des microtubercules reliés entre eux par un trait. Les cercles rouges correspondent à des artéfacts de seuillage. Ces objets qui ne représentent pas des microtubercules sont à éliminer de manière manuelle. Le rectangle bleu correspond au champ d'observation réduit de la Figure 65.....	148
Figure 67 : Comparaison de la distance entre microtubercules en choisissant de mesurer la distance entre les sommets des microtubercules (ce travail) ou bien la distance séparant leur base (d'après Gayet et Meunier, 2001).	149
Figure 68 : Image de l'ornementation des microtubercules prise au Microscope Electronique à Balayage (MEB)	149
Figure 69 : Comparaison de l'ornementation d'une même zone d'une écaille observée directement au microscope électronique à balayage (MEB) et en microscopie optique après réalisation d'une réplique de la surface (peel).	150
Figure 70 : Influence de l'angle d'inclinaison du faisceau d'électron (tilt) avec la normale à la surface de la ... ganoïne. a) Angle de tilt de 0° : les mesures des distances sont correctes mais le contraste de l'image faible. b) angle de tilt de 20° : les microtubercules sont mieux visibles (effet de perspective) mais l'image est distordue et les distances réduites selon l'axe de tilt. c) vue générale de l'écaille. d) superposition de la mesure des distances entre des objets identiques sur les vues a) et b)	151
Figure 71 : Présence d'un ombrage sur les microtubercules de l'image MEB à gauche. L'image de droite montre la difficulté à seuiller correctement les contours des microtubercules suite à cet ombrage : seules	

les ombres (bleues) ou les parties brillantes (jaunes) de chaque microtubercule pourront être seuillées avec un niveau de gris donné.	152
Figure 72 : Comparaison des profils de niveau de gris réalisés au travers de la section d'un microtubercule d'après une image de microscopie électronique à balayage et une image de microscopie optique ; (a) Image prise au MEB et (a') profil d'intensité associé selon le trait rouge ; (b) image prise en microscopie optique par contraste de phase sur un peel et (b') profil d'intensité associé selon le trait rouge.	152
Figure 73 : observation en microscopie à force atomique de la surface de la ganoïne. Vue en code couleur à gauche et en perspective à droite de la hauteur relative des microtubercules.	153
Figure 74 : observation en microscopie à force atomique. Vue en code couleur de la hauteur relative des microtubercules (image de gauche) et mesure quantitative des hauteurs des microtubercules situés le long du segment de droite brisée de couleur bleue.	153
Figure 75 : Spécimen JRE.2008. Comparaison des variations de hauteur des microtubercules en AFM prise selon un contour (figures A et A') avec les variations relatives de niveaux de gris des microtubercules prises sur un contour différent provenant d'une image de microscopie en contraste de phase d'un peel (figures B et B').	154
Figure 76 : Spécimen JRE.2008. Comparaison du profil de hauteur d'un microtubercule à partir d'une image AFM (figures A et A') avec deux profils de niveau de gris caractérisant deux microtubercules distincts. Les profils B et C proviennent de deux microscopes différents dont l'un est équipé d'une échelle dynamique d'acquisition plus grande et d'un système de phase avec une compensation du « halo » (profil C)	155
Figure 77 : Détermination des aires des microtubercules avec un seuillage global (« atractosteus » fait référence à l'espèce <i>Atractosteus spatula</i> et « tristoechus » à l'espèce <i>Atractosteus tristoechus</i>)	156
Figure 78 : Détermination des diamètres moyens des microtubercules en fonction de la position anatomique du peel sur le spécimen. Il s'agit ici du spécimen MNHN 0000-5760 récolté par Bocourt en 1871 au Guatemala.	157
Figure 79 : Lepidotes JRE.2008. Premières observations qualitatives des microtubercules sur un microscope Nacet équipé en contraste de phase. Limite entre deux strates de ganoïne (flèches bleues). Les dimensions des microtubercules sont notablement différentes entre les deux strates (diamètres et distances). Sur la partie gauche de l'image la distance moyenne entre microtubercules voisins est de 12,8 microns (n=100, SD=1,6), elle est de 9,8 microns sur la partie droite (n=100, SD=1,4)	158
Figure 80 : Spécimen n°KS12-265 de † <i>Thaiichthys buddhabutrensis</i> . La position anatomique des peels référencés du n°1 au n°8 est indiquée par les cercles rouges (peels réalisés par U. Deesri).	159
Figure 81 : Comparaison des ornements de microtubercules (observations en D.I.C. au même grandissement) entre † <i>Thaiichthys buddhabutrensis</i> , <i>Polypterus senegalus</i> , JRE.2008 et Ban Sap Hin A1667.	160
Figure 82 : Observations en D.I.C des différents peels de † <i>Thaiichthys buddhabutrensis</i> . Les peels références peel 8, 8b et 8c correspondent à différentes zones prises sur le peel n°8. On peut observer les différents défauts topographiques (poussières, rayures, etc..) qui interfèrent lors de l'étape de seuillage et doivent être filtrés.	161
Figure 83 : Lepidotes JRE.2008. Ecaille brisée à son bord postérieur. Observation au MEB de l'ornementation des microtubercules à la surface de l'écaille (à droite), mais aussi sur une strate interne de ganoïne à l'issue de sa délamination (au centre de l'image), près du bord brisé.	162
Figure 84 : Lepidotes JRE.2008. Zone de ganoïne localement dégradée (de couleur blanche et de nature friable). Phénomène de délamination entre chaque strate. Le relief des microtubercules est encore visible au niveau des différentes strates, bien que la ganoïne soit ici très dégradée.	163
Figure 85 : Comparaison du phénomène d'auto-organisation généré par une réaction chimique du nom de CIMA (image de gauche extraite du livre « Shapes » (Ball , 2009)) et de l'ornementation des microtubercules observés en microscopie optique par contraste de phase sur le spécimen JRE.2008	

(image de droite). Les motifs hexagonaux (bleus) sont très majoritaires par rapport aux motifs pentagonaux (rouge) et heptagonaux (verts).....	163
Figure 86 : Simulations réalisées par H. Meinhardt en 2010 du motif de points observé sur les images de microscopie optique par contraste de phase des peels selon un modèle théorique d'activation-inhibition ou bien un modèle d'activation et de déplétion du substrat (communication personnelle).....	164
Figure 87 : Test de normalité et diagrammes Q-Q plot : les mesures des grands diamètres des populations de microtubercules d' <i>Atractosteus spatula</i> (Atrac Z1) ou de <i>Polypterus senegalus</i> (Pol Z2) selon les différentes zones observées (Z1, Z2, etc.) ne suivent pas une loi normale.	165
Figure 88 : Box plots associés aux mesures des grands diamètres des microtubercules pour différentes régions (Z1, Z2,...) des espèces suivantes : <i>L. lennieri</i> (Len 83 Zi), sémionotiforme indéterminé JRE.2008 (RPE Zi), <i>Atractosteus spatula</i> (Atrac Zi), <i>Polypterus senegalus</i> (Pol Zi) et † <i>Thaichthys buddhabutrensis</i> (Buddha i).	165

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Dimensions en mm des principaux ossements.....	166
Tableau 2 : Définitions d'Ørvig correspondant aux différents canaux de Williamson	167
Tableau 3 : Hypothèses sur la nature des canaliculi vasculaires de Williamson selon différents auteurs.	167
Tableau 4 : Variation des dimensions selon l'angle de Tilt pour les trois segments du triangle de la Figure 70.	167
Tableau 5 : <i>Polypterus senegalus</i> MNHN 2004-0184. Mesure des aires, des diamètres des microtubercules, et des distances entre voisins, selon le protocole de mesure finalisé. Cinq zones différentes d'un même peel ont été observées et mesurées selon les mêmes conditions sur un microscope Zeiss (Zone 1 à 5). Le microscope (CEMIM) possède un dispositif de correction du halo lumineux observé en mode contraste de phase. Les trois dernières mesures montrent l'influence du protocole de traitement : elles proviennent du traitement d'une même image.	168
Tableau 6 : <i>Atractosteus spatula</i> . Mesure des dimensions des microtubercules selon le protocole finalisé. Toutes les mesures ont été faites sur le même peel, à différents endroits (zones 1 à 5). Deux microscopes avec (CEMIM) et sans (Zeiss) correction du « halo » provenant du contraste de phase ont été utilisés.	169
Tableau 7 : Mesures de l'ornementation des microtubercules chez JRE.2008 et MHNH 7267 réalisées sur le microscope Zeiss. Les références Z1, Z2, Z3 correspondent à différentes zones d'observation sur un même peel ; les chiffres entre parenthèse indiquent le temps de l'exposition lors de l'acquisition des images. Im8283 et Im8284 font références à deux écailles différentes pour <i>Macrosemimimus lenieri</i>	170
Tableau 8 : Test statistique réalisé sur les moyennes des moyennes des diamètres (grand axe) du Tableau 7.	170
Tableau 9 : Mesures de l'ornementation des microtubercules chez <i>Lepidotes buddhabutrensis</i> réalisées sur le microscope Zeiss. Cinq Peels réalisées à différents endroits ont été réalisés et analysés selon notre protocole finalisé. * Les Peels n°2 et 7 présentent des défauts topographiques et le nombre de mesures est réduit sur ces derniers.	171
Tableau 10 : Comparaison des ornements de <i>Thaichthys buddhabutrensis</i> et <i>Polypterus senegalus</i> . Test statistique bilatéral réalisé sur les moyennes des moyennes des grands diamètres (observations issues des Tableau 5 et Tableau 9)	171

FIGURES.

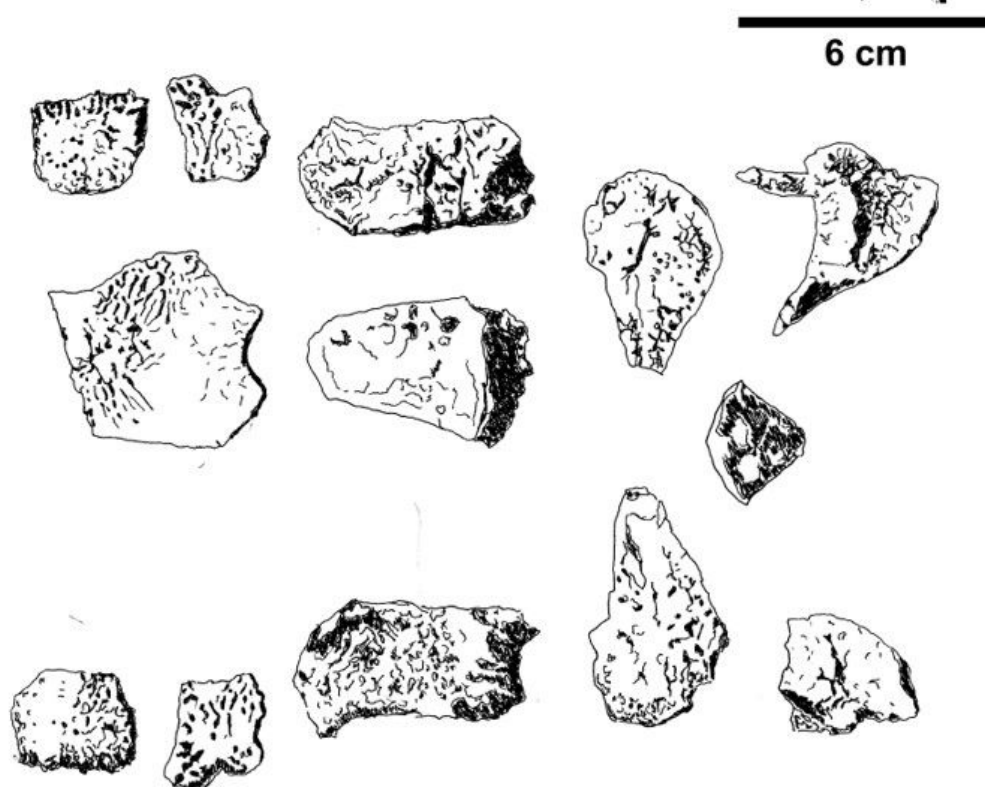
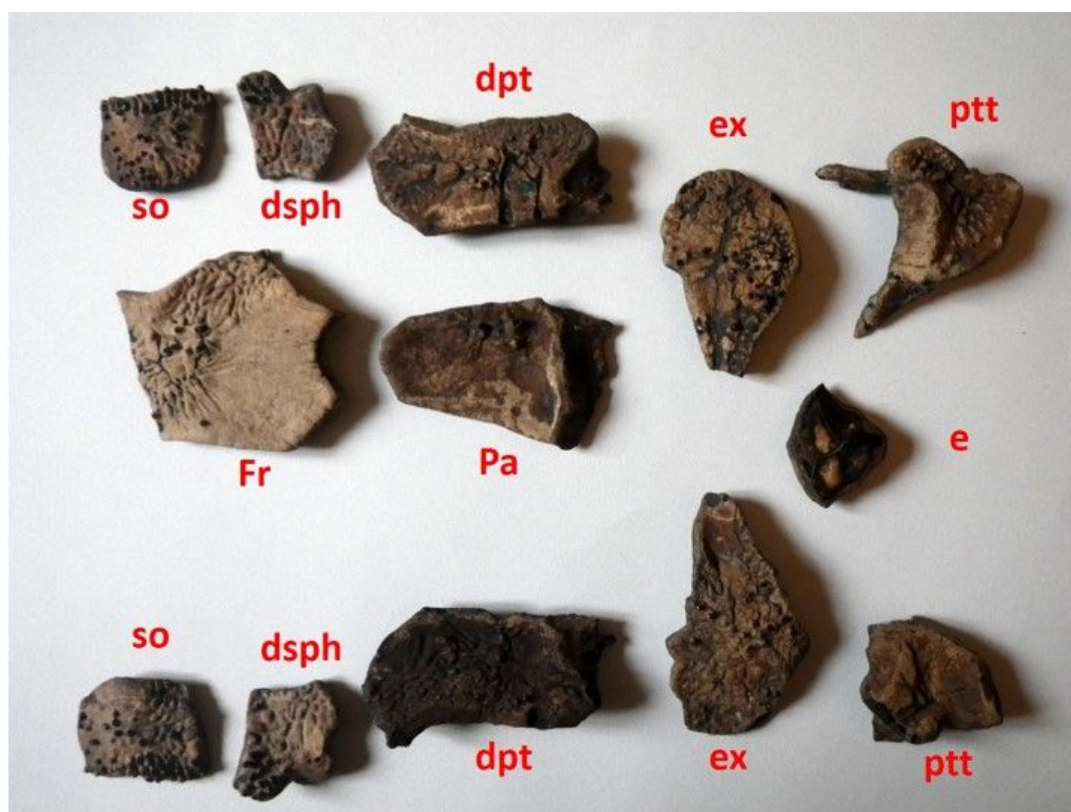


Figure 1 : Vu éclatée des os du toit crânien (Fr : frontal ; Pa : pariétal ; e : écaille ; ptt : posttemporal ; ex : extrascapulaire ; dsph : dermosphénotique ; dpt : dermoptérotique ; so : sousorbital)

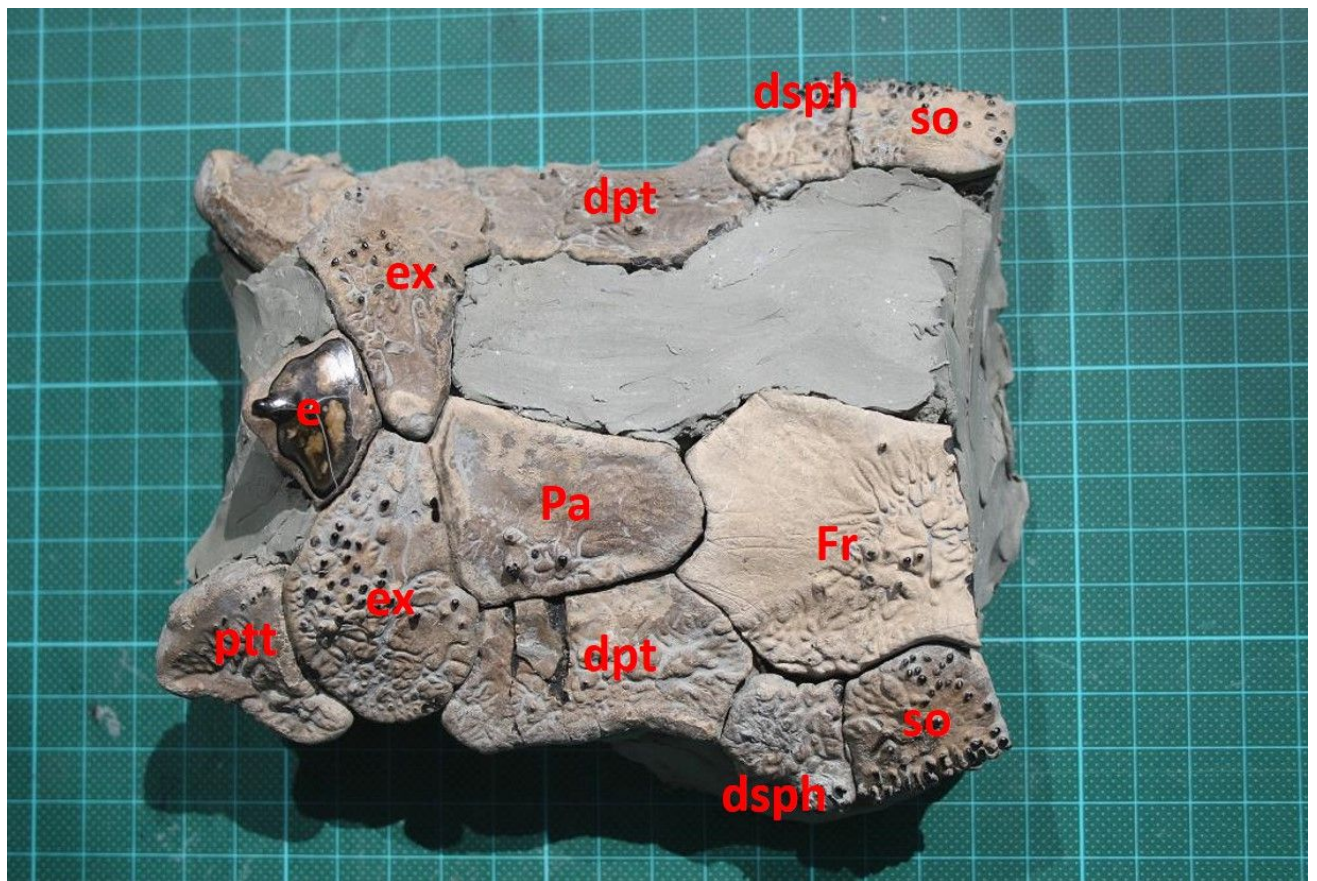
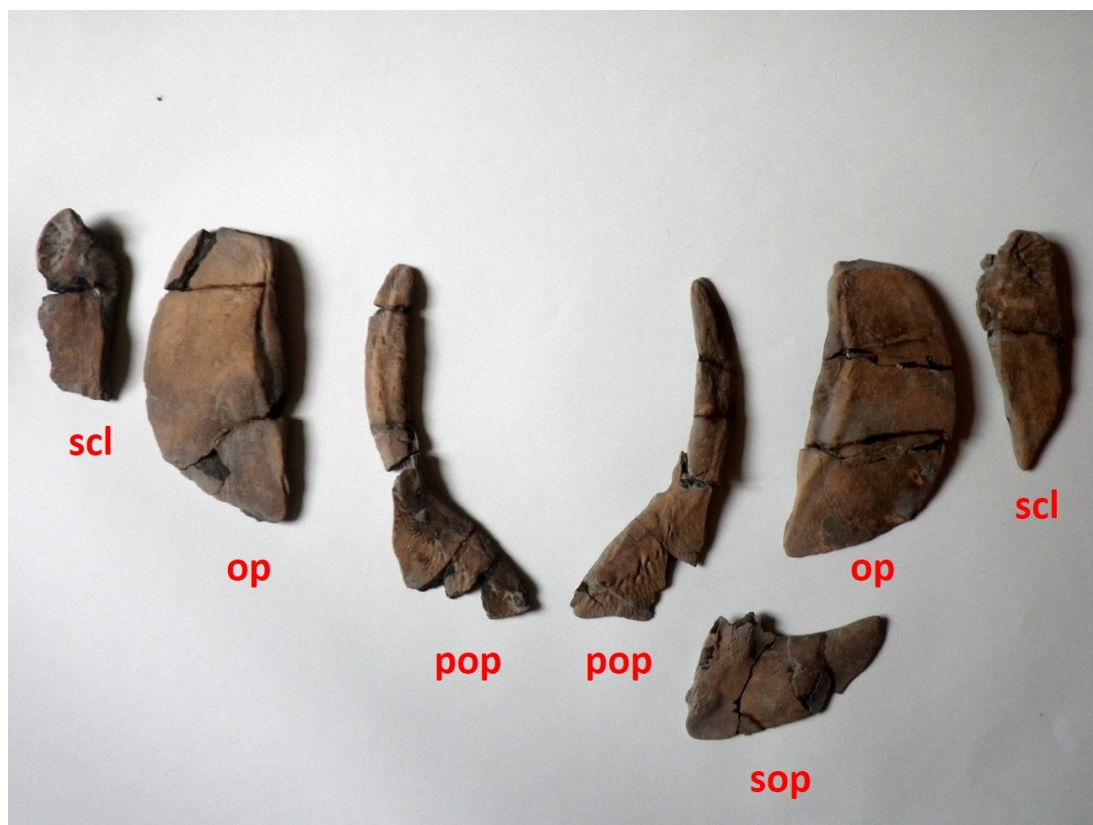


Figure 2 : Mise en connexion anatomique des os du toit crânien. Echelle : petits carrés verts de 1cm de côté..



6 cm

Figure 3 : vue éclatée des os de la joue (op : opercule ; sop : sousopercule ; pop : préopercule, scl : suprachleitrum)



Figure 4 : connexion anatomique entre l'opercule et le sous-opercule (cf. légende de la Figure 3)



Figure 5 : fragments de la dentition. La couronne des dents est située au sommet d'un pédicule et présente au niveau de l'apex une petite pointe plus ou moins émoussée. La base des dents est plus ou moins ovale. Les dents marginales sont nettement plus petites que les dents internes et leurs pointes sont moins émoussées (vo : vomer)



Figure 6 : Écailles des flancs. Elles possèdent deux processus articulaires marqués orientés selon l'axe antéro-postérieur. Ils sont situés aux bords antéroventral et antérodorsal. Les écailles de gauche n'ont pas d'articulation « peg and socket » contrairement aux écailles de droite, qui présentent également un processus articulaire selon l'axe dorsoventral. Echelle : petits carrés verts de 1cm de côté.



Figure 7 : Les écailles de gauche, très épaisses, ont les processus antéroventral et antérodorsal inclinés dorsalement. Elles proviennent de la région ventrale. Les écailles de droite n'ont pas de processus articulaire marqué. Echelle : petits carrés verts de 1cm de côté.



Figure 8 : Différentes écailles de symétrie axiale ou proche. Les écailles de droite présente une pointe sur leur partie postérieure et sont situées au niveau la ligne dorsale. Echelle : petits carrés verts de 1cm de côté.



Figure 9 : Comparaison des dimensions des opercules et sous opercules. A gauche le spécimen †M. lennieri du Kimméridgien d'Angleterre, au centre le spécimen JRE.2008 du Kimméridgien du Havre, à droite le spécimen †L. leedsi.

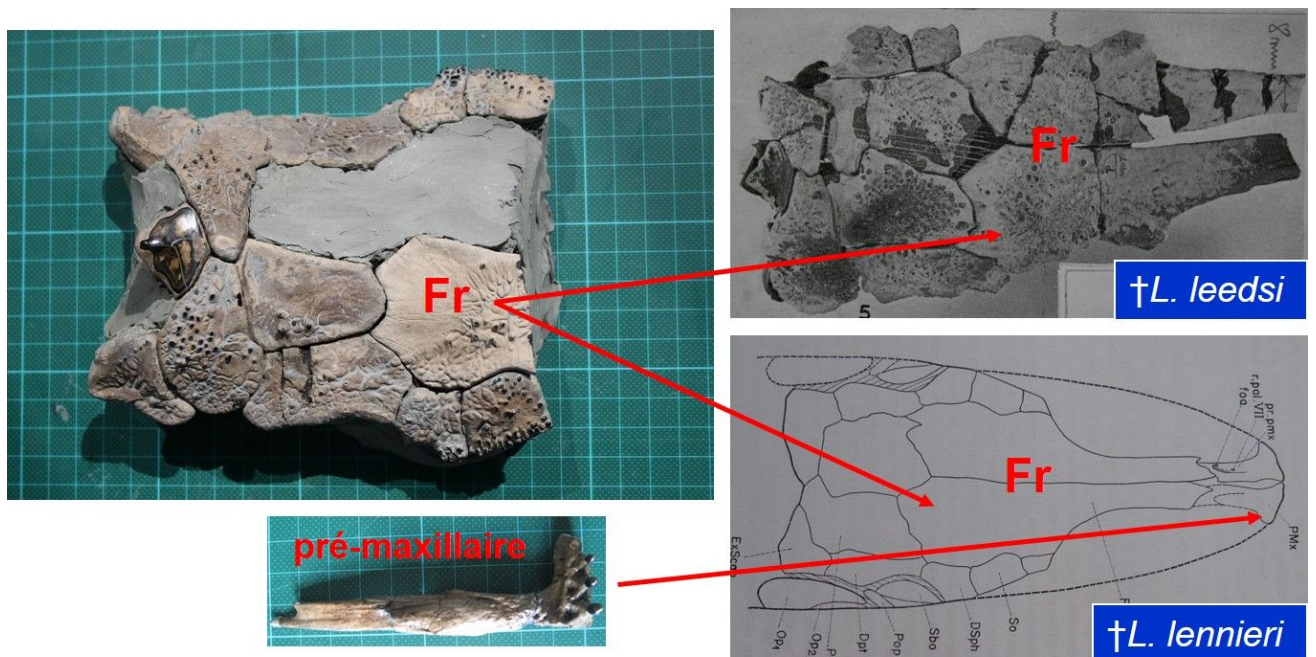


Figure 10 : Comparaison du toit crânien avec ceux de †M. lennieri et †L. leedsi.

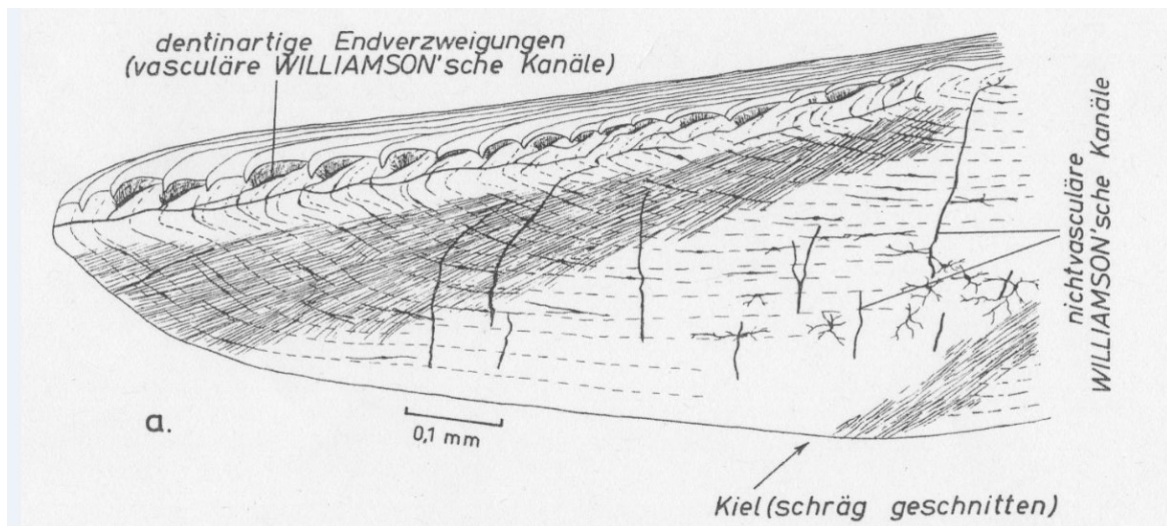


Figure 11 : Canaux vasculaires de Williamson (ou canaliculus de Williamson de type II) chez †*Histionotus angularis*, d'après (Schultze, 1966).

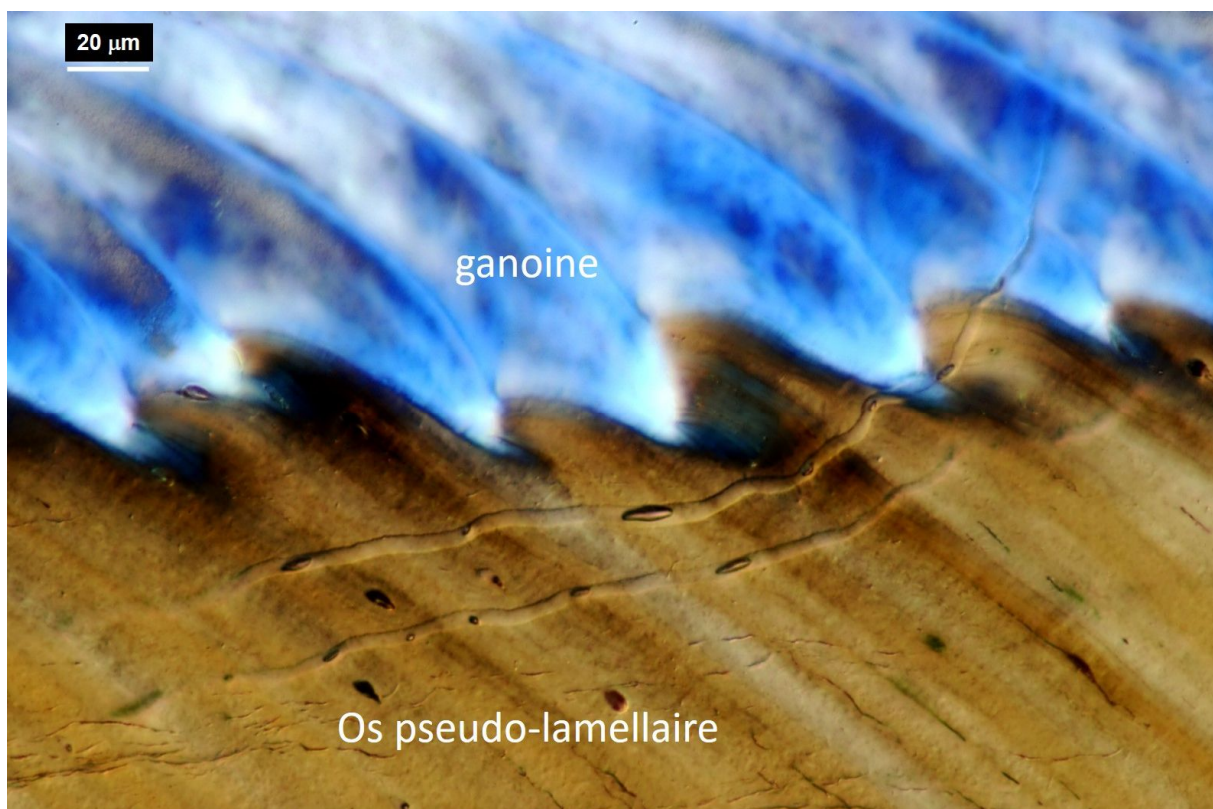


Figure 12 : Spécimen JRE.2008. Observation en D.I.C. Absence locale de dentine entre l'os pseudo-lamellaire et la ganoïne. Deux canaliculi de Williamson dont l'un traverse les strates de ganoïne.

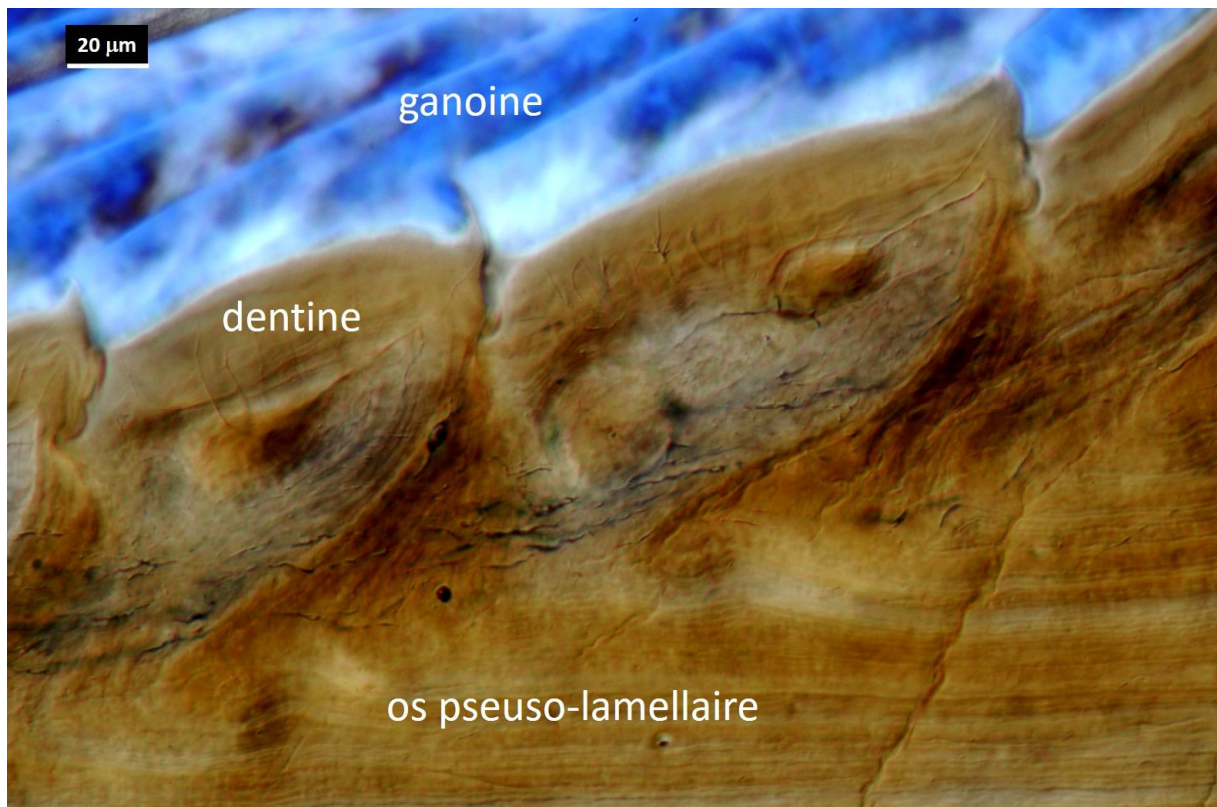


Figure 13 : Lepidotes JRE.2008. Observation en D.I.C. Présence locale de dentine entre l'os pseudo-lamellaire et la ganoïne.

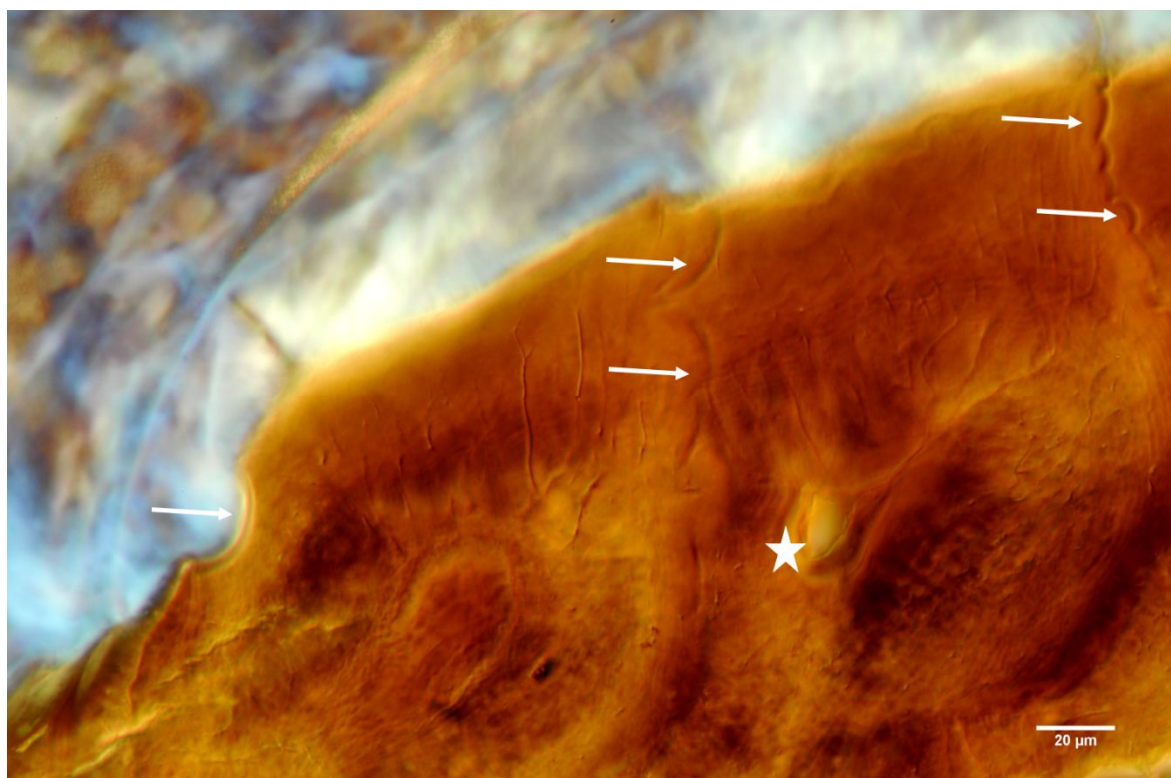


Figure 14 : Spécimen JRE.2008. Observations en D.I.C. Unités de dentine avec lignes de résorption (flèches blanches : lacunes de Howship) et cavité vasculaire (étoile blanche).

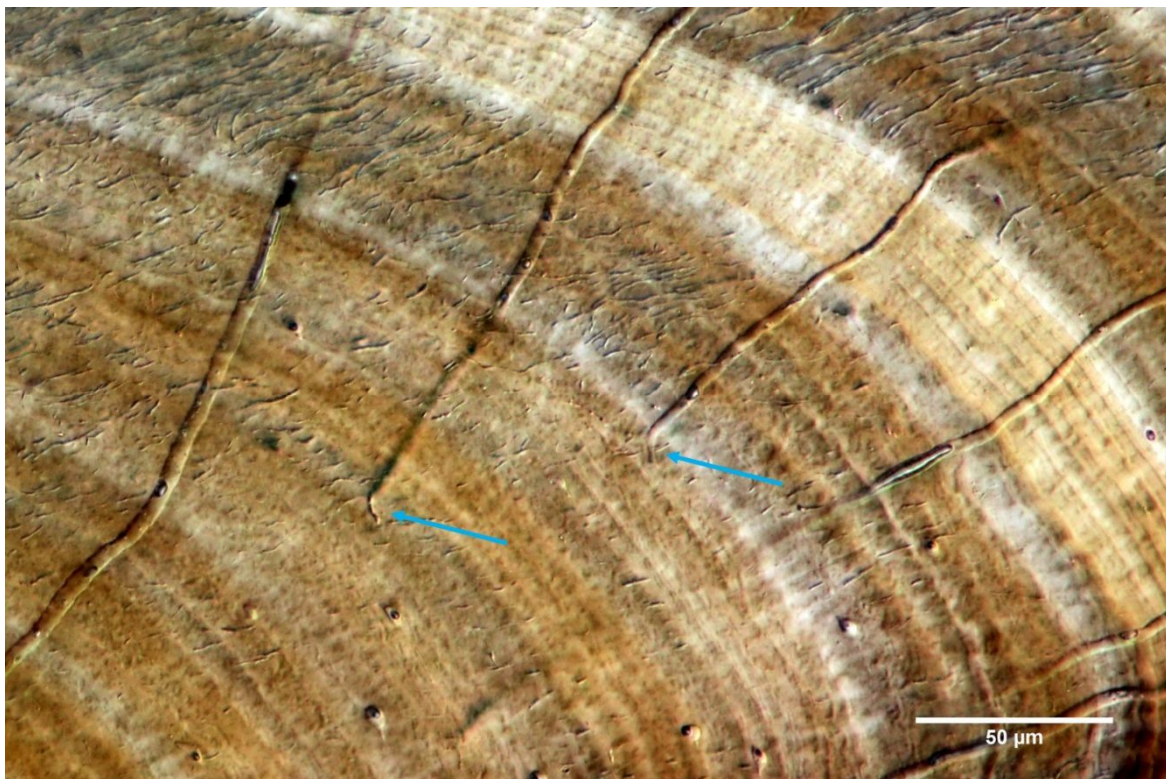


Figure 15 : *Lepidotes JRE.2008*. Observation en D.I.C. Canaliculi de Williamson traversant la lame basale presque perpendiculairement aux lignes d'accroissement de l'écaille, les flèches indiquent les extrémités caractéristiques en plumet des canaliculi.

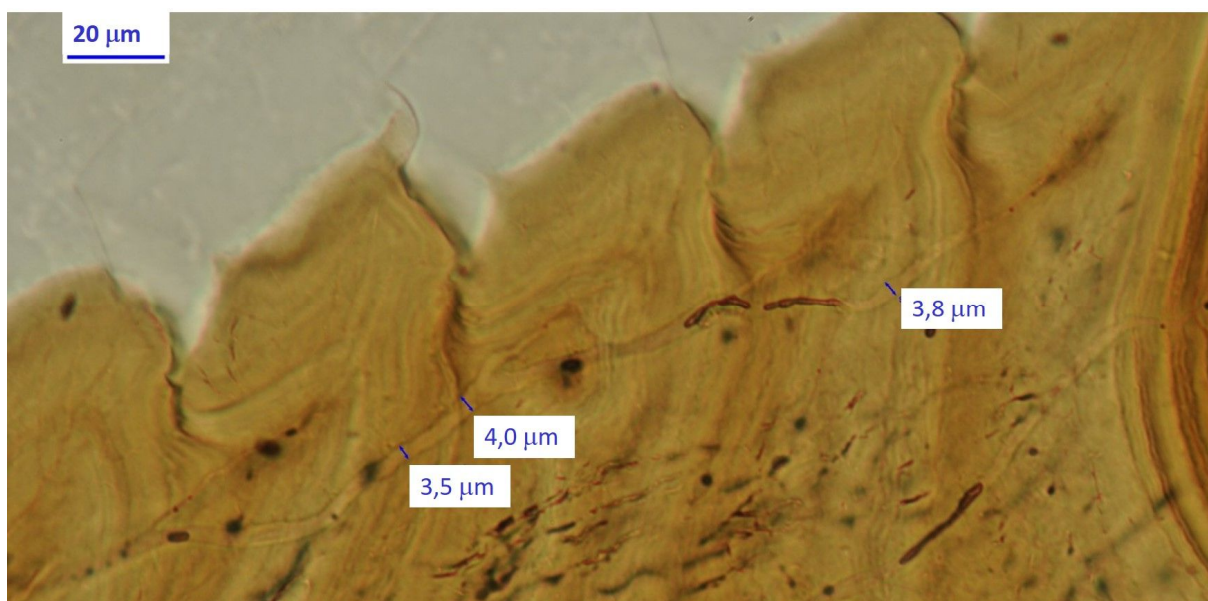


Figure 16 : *Lepidotes JRE.2008*. Observation en champ clair. Canaliculus de Williamson de type II de 3 à 5 microns d'épaisseur, présentant des ramifications, et dont les extrémités sont en connexion avec différents incréments de dentine.

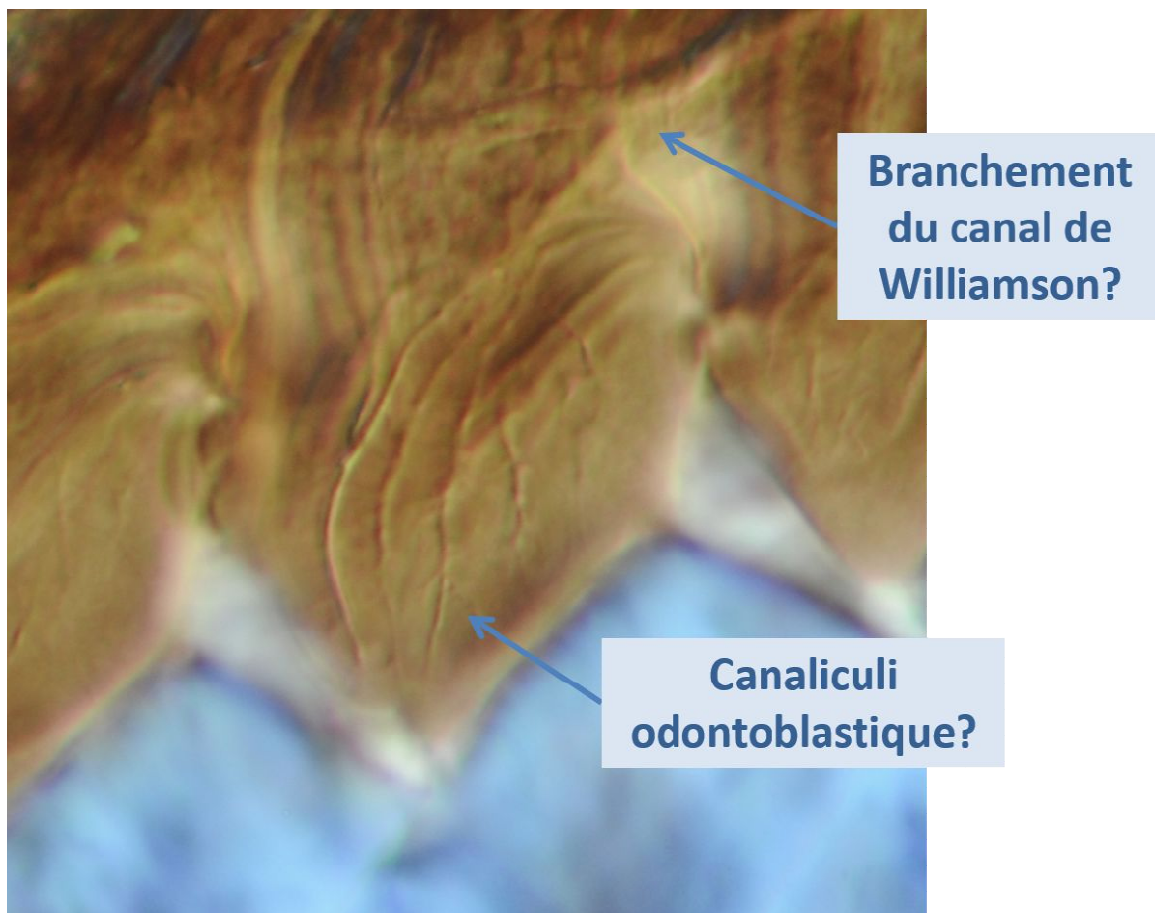


Figure 17 : *Lepidotes JRE.2008*. Observation en D.I.C. Extrémité d'un canaliculus de Williamson de type II situé dans la dentine

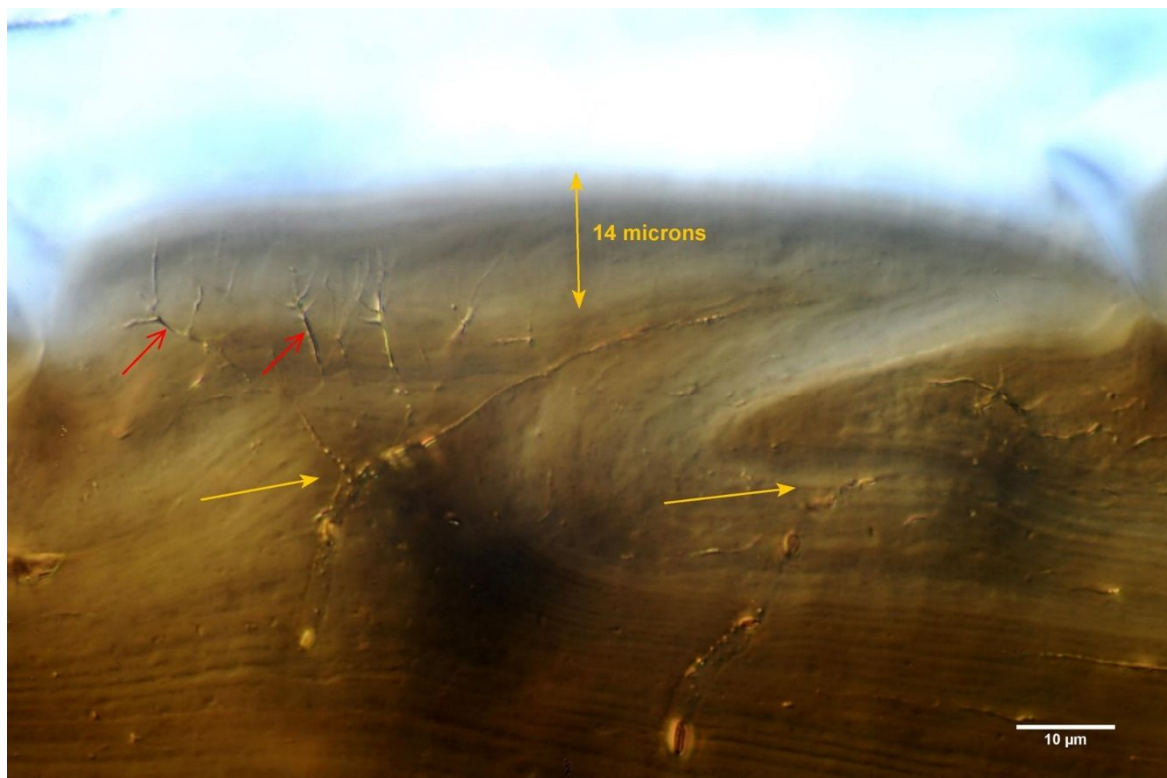


Figure 18 : *Lepidotes JRE.2008*. Observation en D.I.C. Présence d'un canalculus de Williamson de type II sur la gauche et d'un canalculus de Williamson sur la droite (flèches jaune). Les extrémités du canalculus de Williamson de type II prennent naissance dans la dentine à proximité des canalliculi odontoblastiques (flèches rouge). Cette dernière est peu développée en épaisseur.

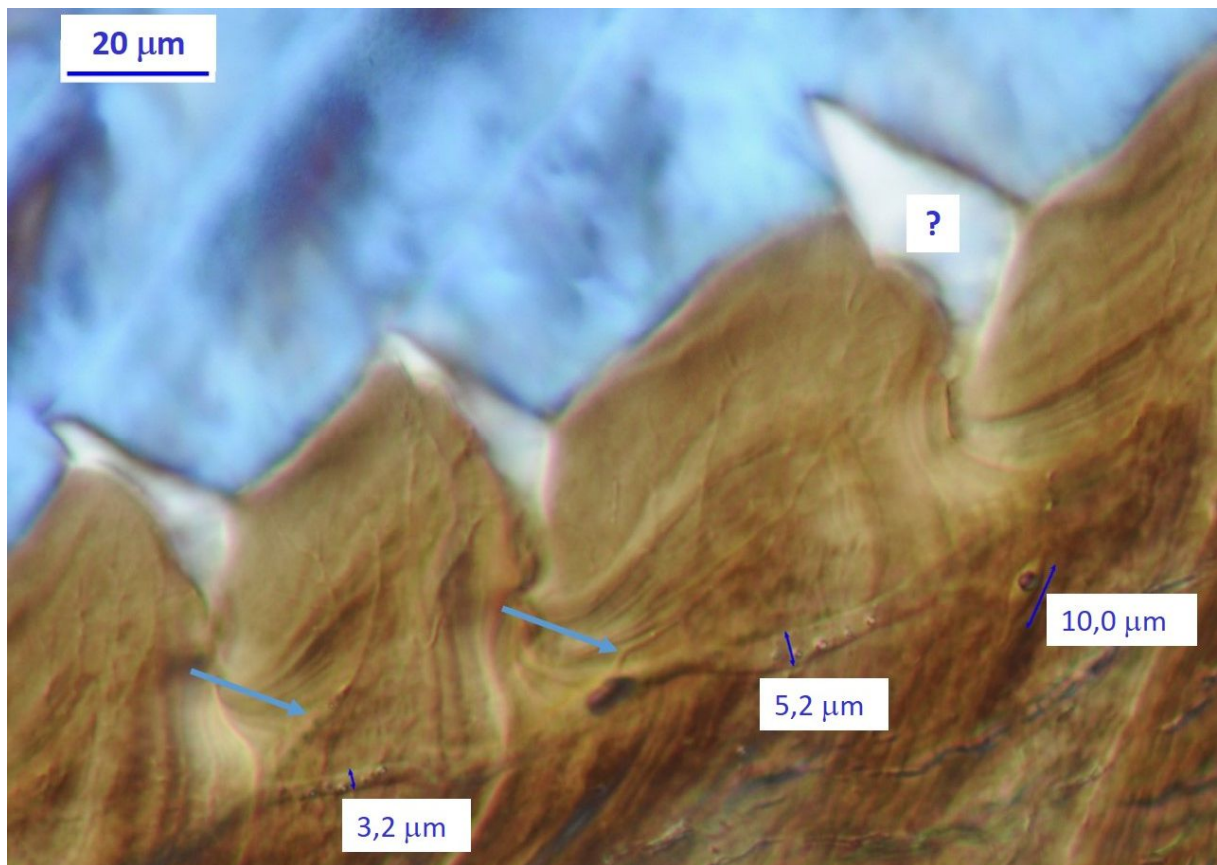


Figure 19 : Lepidotes JRE.2008. Observation en D.I.C. Extrémités d'un canaliculus de Williamson de type II dans deux unités de dentine adjacentes. Un ostéocyte est également à proximité

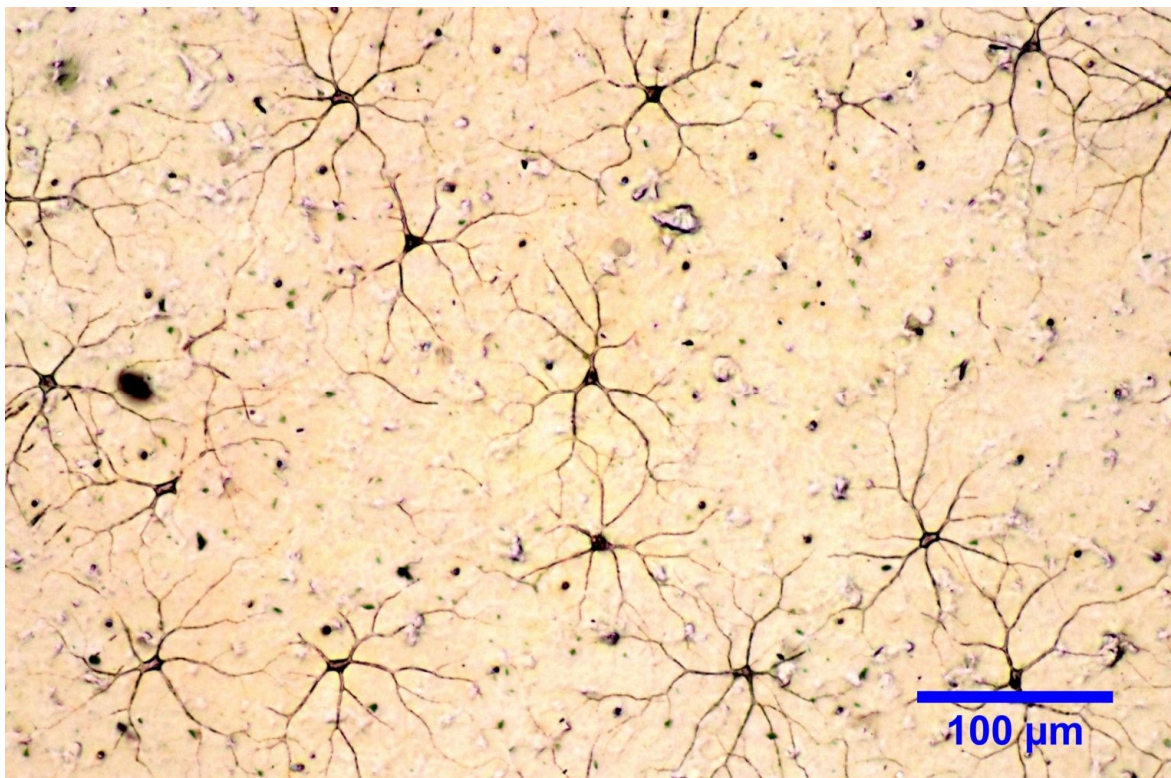


Figure 20 : Lepidotes JRE.2008. Observation en champ clair. Coupe tangentielle à la surface. Observation des ostéocytes et des connexions entre voisins.

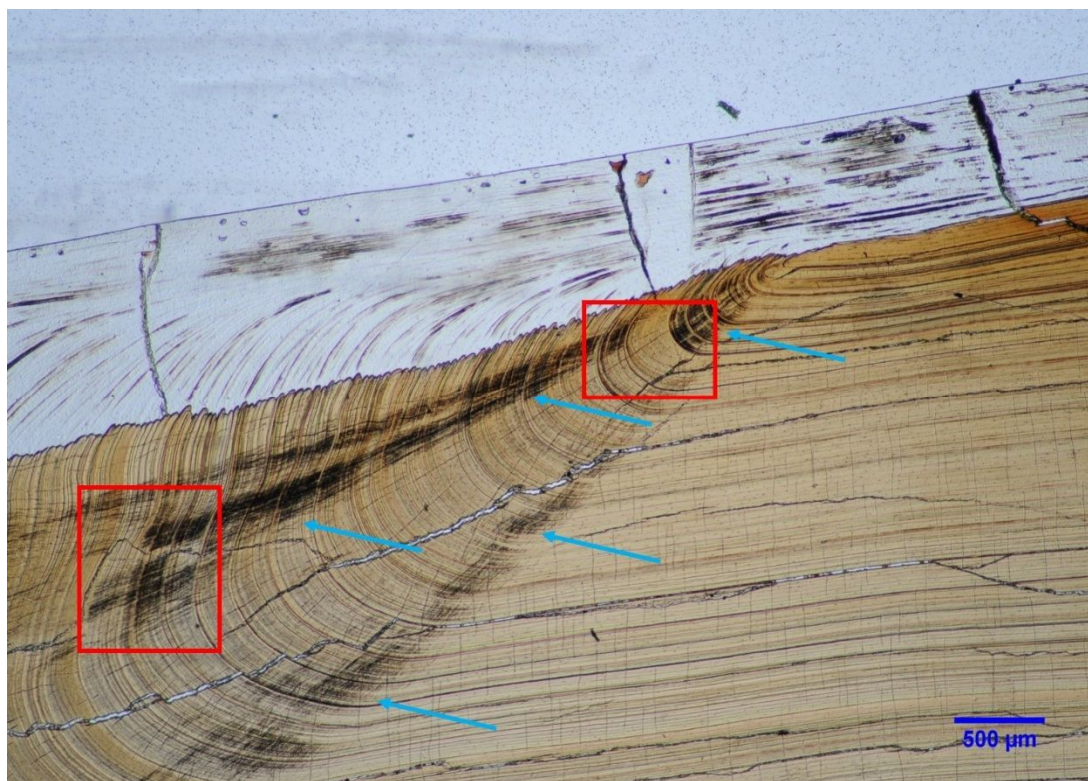


Figure 21 : *Lepidotes JRE.2008*. Observation en champ clair. Fibres de Sharpey (flèches). Les rectangles rouges correspondent à des régions où la diagénèse modifie le contraste de couleur noire des fibres de Sharpey.

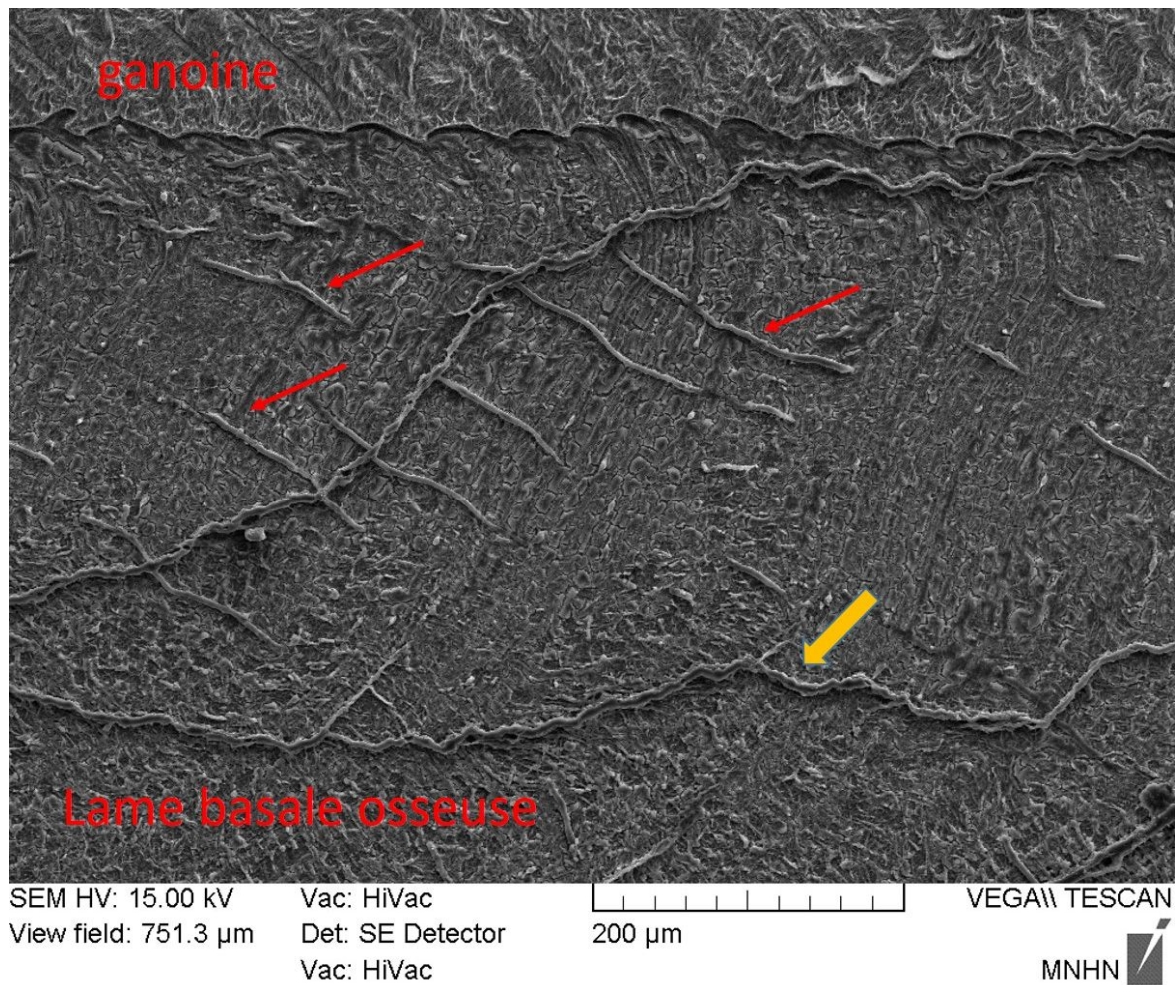
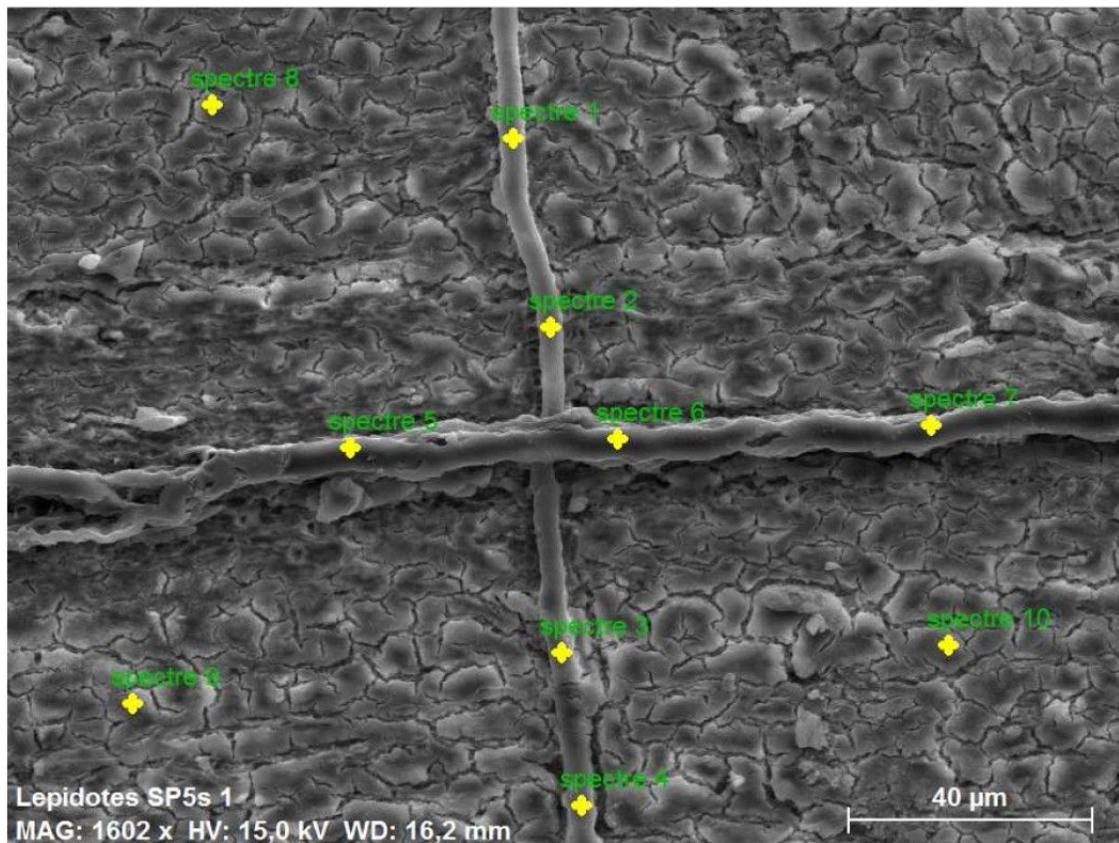


Figure 22 : *Lepidotes JRE.2008*. Observation de la surface au MEB. Observation d'un canal vasculaire (flèche orange) et de canaliculi de Williamson (flèches rouges) dans la lame basale.



Lepidotes SP5s 1

Figure 23. Observation au M.E.B. Localisation des analyses EDX réalisées sur un canaliculus de Williamson orienté verticalement et un capillaire vasculaire orienté horizontalement.

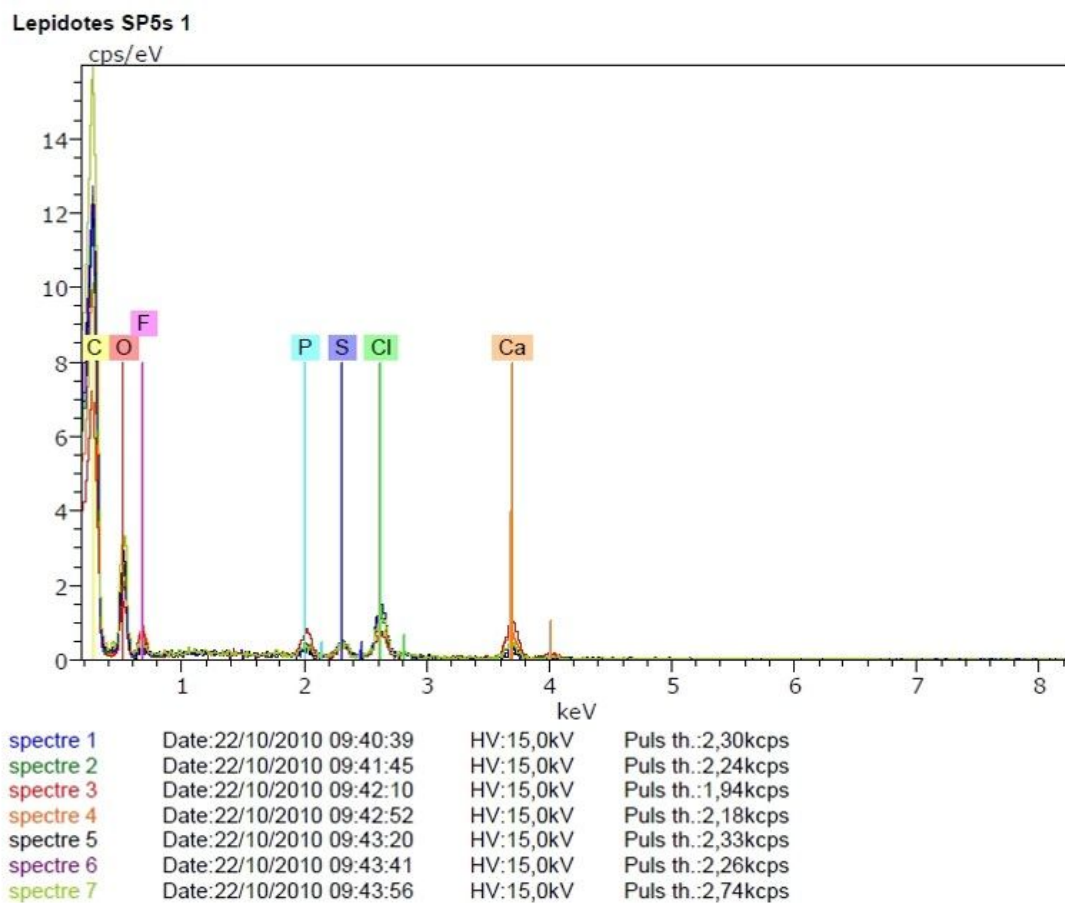
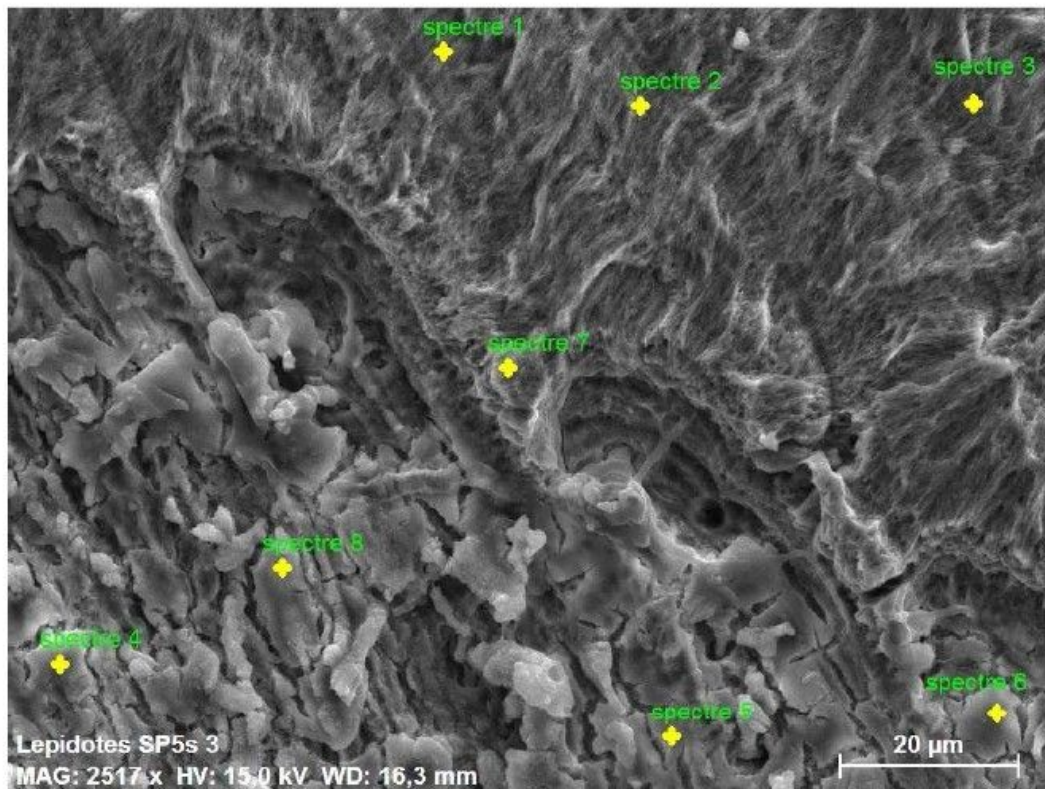


Figure 24 : Analyse EDX des canaliculi de Williamson et de canaux vasculaires localisés sur la Figure 23 : le pic du carbone est très important vis-à-vis des autres éléments comme le phosphore ou le calcium.



Lepidotes SP5s 3

Figure 25 : Ganoïne et plaque basale observée en microscopie électronique à balayage. Les pointages correspondent aux endroits où ont été réalisées les analyses élémentaires.

Lepidotes SP5s 3

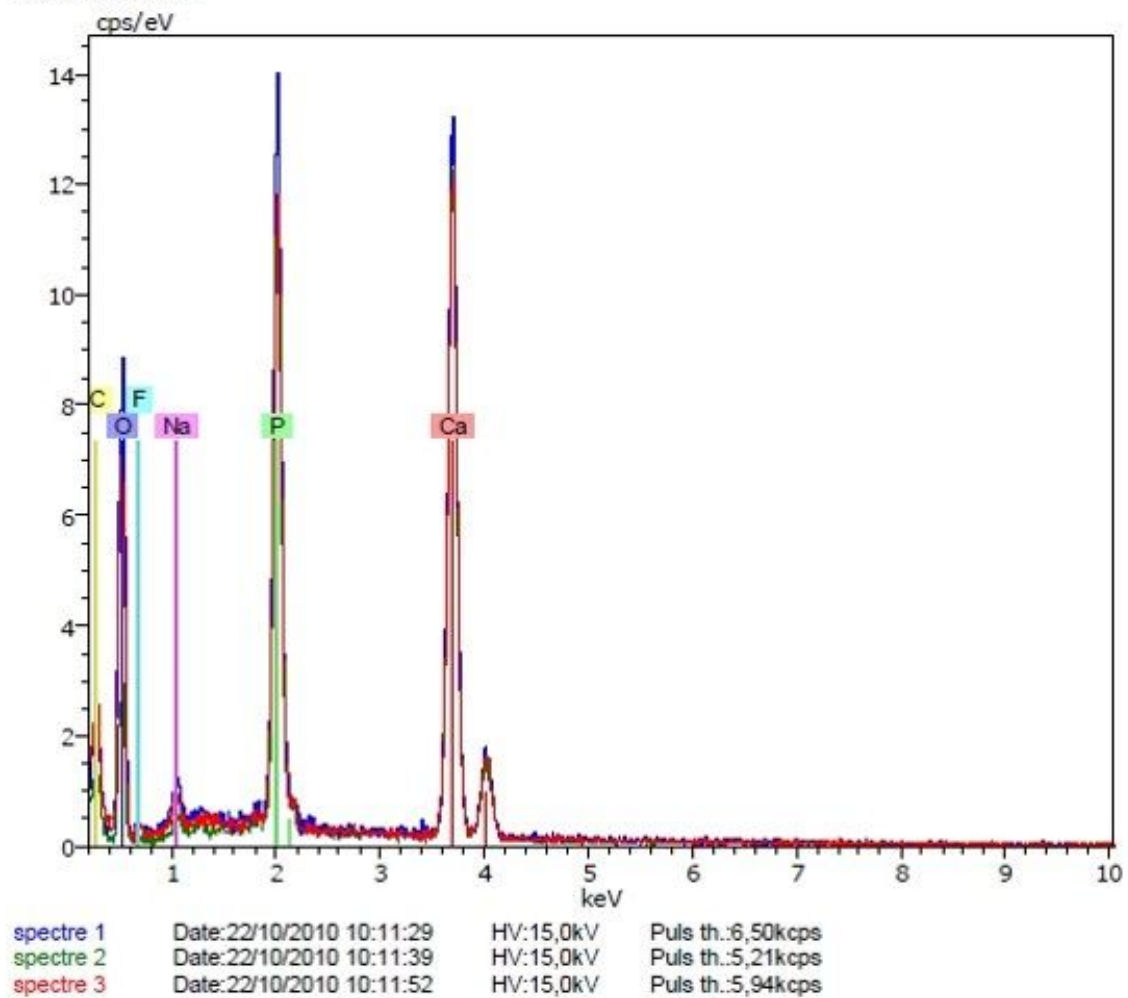


Figure 26 : analyse EDX de la ganoïne de la Figure 25 : absence de fluor, le pic du carbone est très faible (il s'agit ici d'une métallisation au carbone de la surface d'une épaisseur de 20 nm. La profondeur d'observation en analyse élémentaire est de l'ordre du micron.

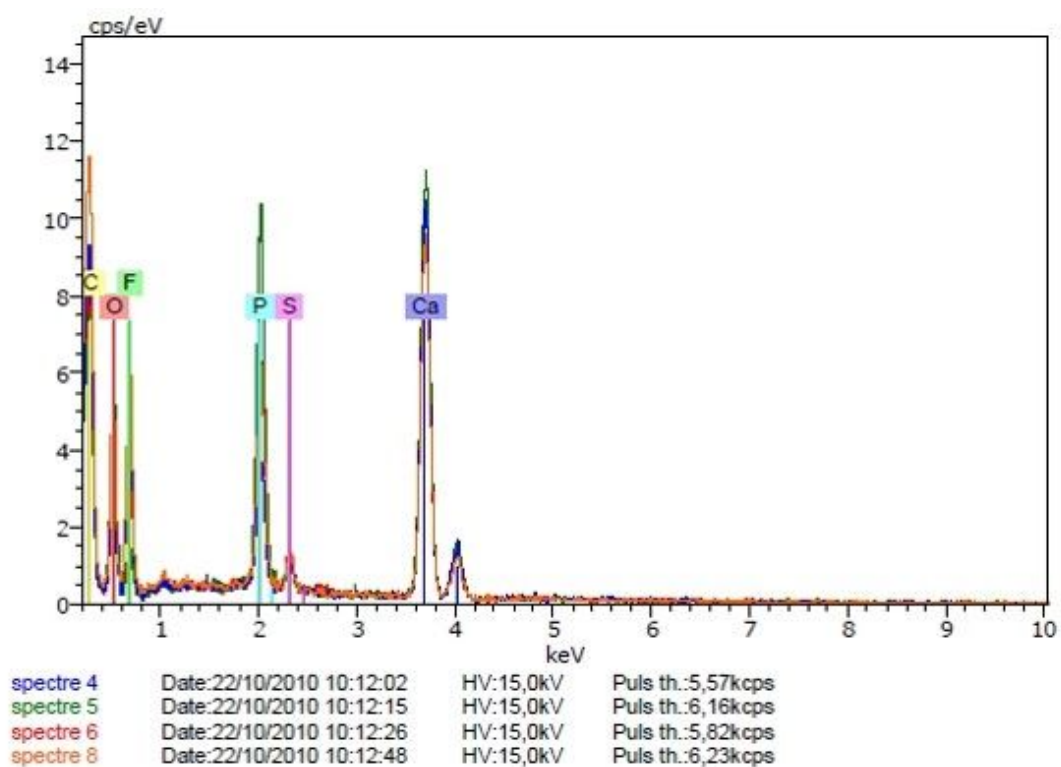


Figure 27 : Analyse EDX de la lame basale de la Figure 25 : présence notable de fluor. L'intensité du pic du carbone est nettement plus importante qu'au sein de la ganoïne (cf. Figure 26).

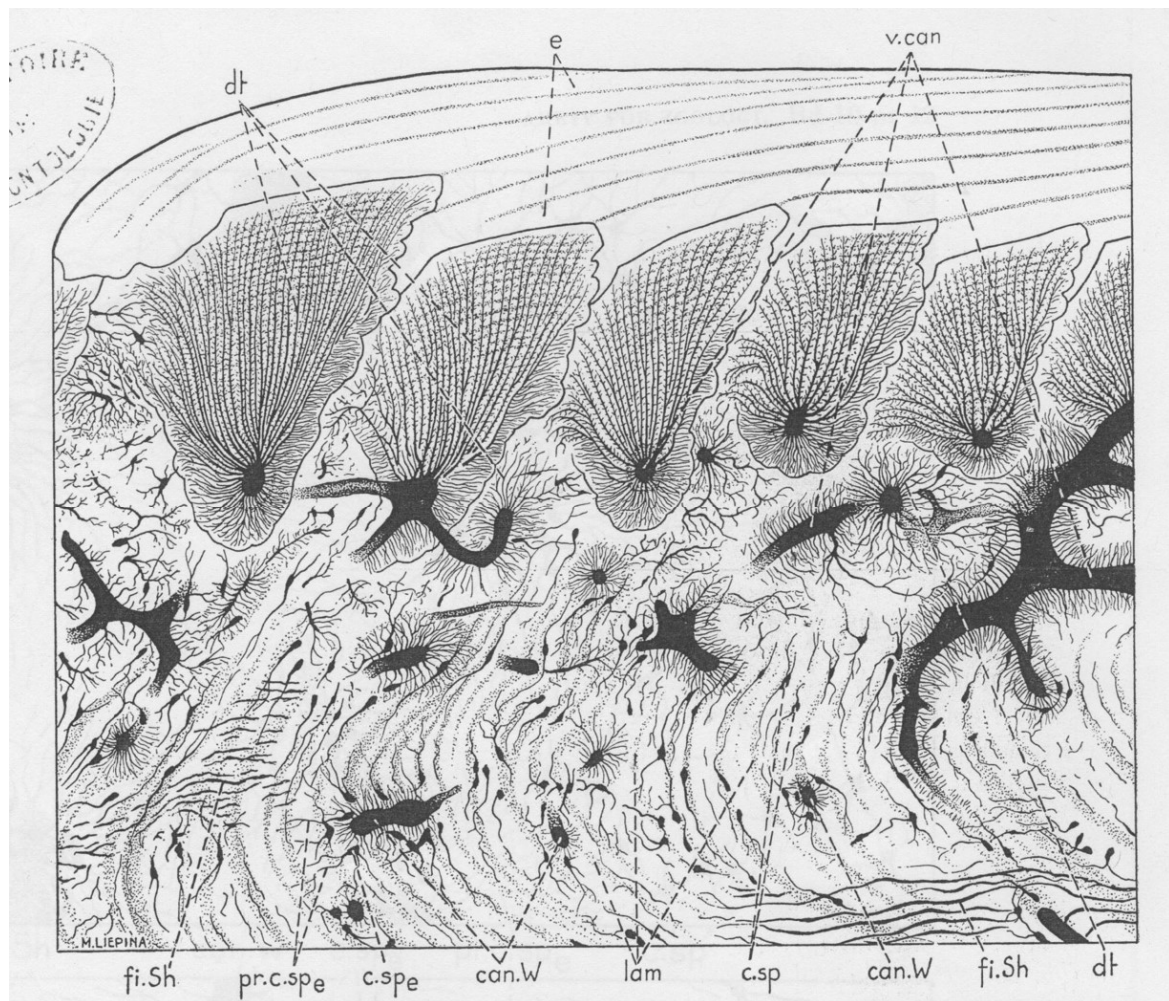


Figure 28 : Ecaille de †*Scanilepis dubia*. Odontocomplexe, constitué d'unités de dentine adjacentes séparées par des lignes de résorption (d'après Ørvig, 1978a).

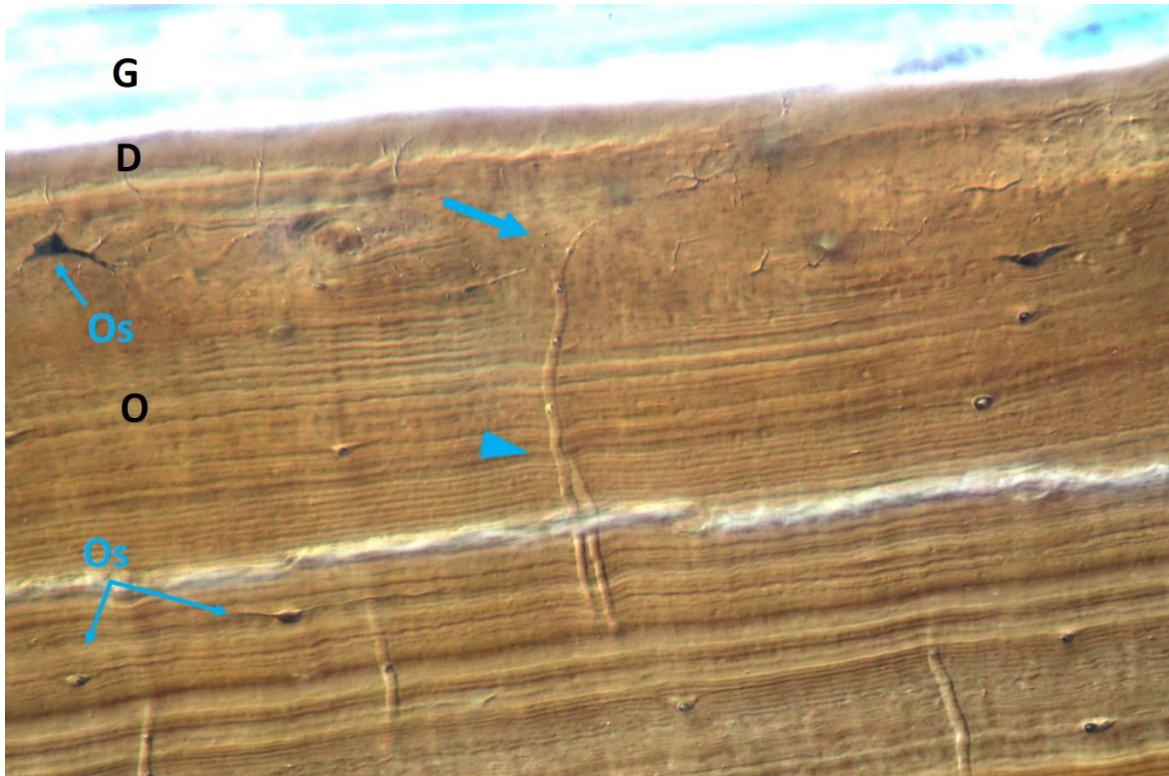


Figure 29 : *Lepidotes* JRE.2008. Initium. Canaliculus de Williamson présentant deux branches (tête de flèche), et dont l'extrémité (flèche) est à proximité de l'initium. G : Ganoïne; D : Dentine, O : Os. , Os : ostéocytes. La partie osseuse juste sous la dentine semble faite d'os fibreux d'après la forme étoilée de l'ostéocyte situé en haut et à gauche de l'image, puis elle devient rapidement pseudo-lamellaire avec des ostéocytes (en bas à gauche) orientés dans le sens des fibrilles de collagène.



Figure 30 : Lepidotes JRE.2008. Coupe tangentielle à la surface de l'écaille et traversant les couches d'os et de dentine. Rectangle : jonction entre l'extrémité en plumet d'un canaliculus de Williamson et un ostéocyte. Tête de flèche : branchement au niveau d'un canalicule. Flèche : extrémité d'un canaliculus de Williamson de type II en connexion avec la dentine.

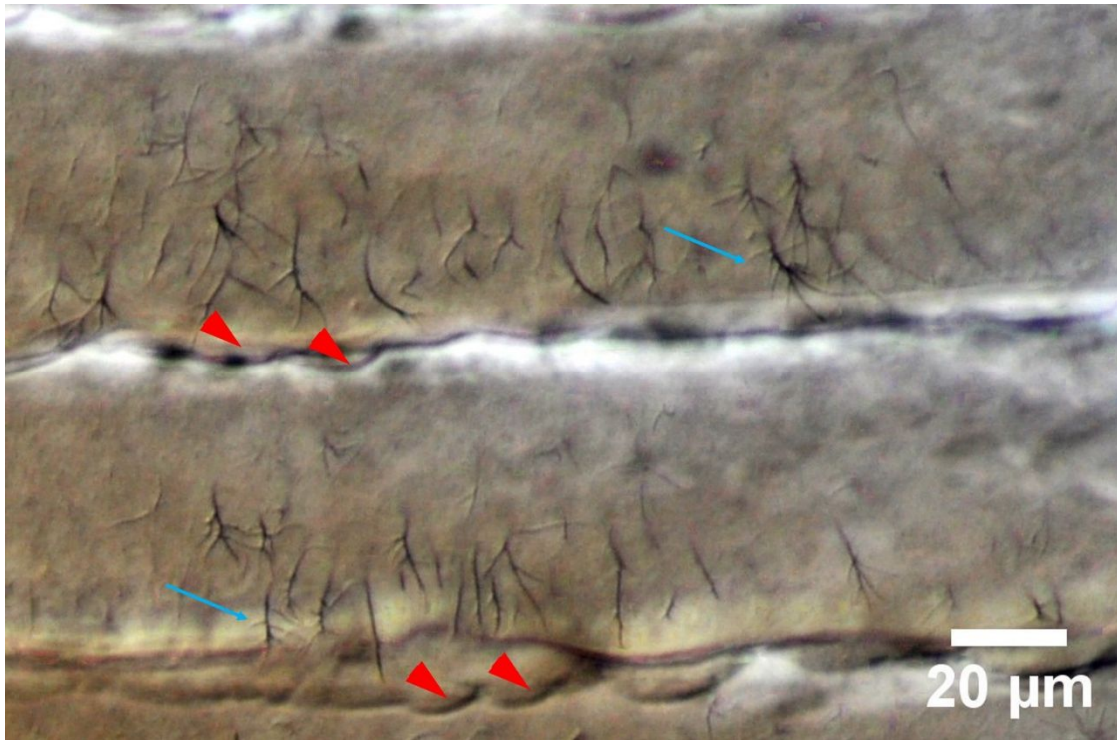


Figure 31 : Agrandissement de la figure 19. Canaliculi odontoblastiques de la dentine (flèche bleue) et lacunes de Howship (têtes de flèches rouges)

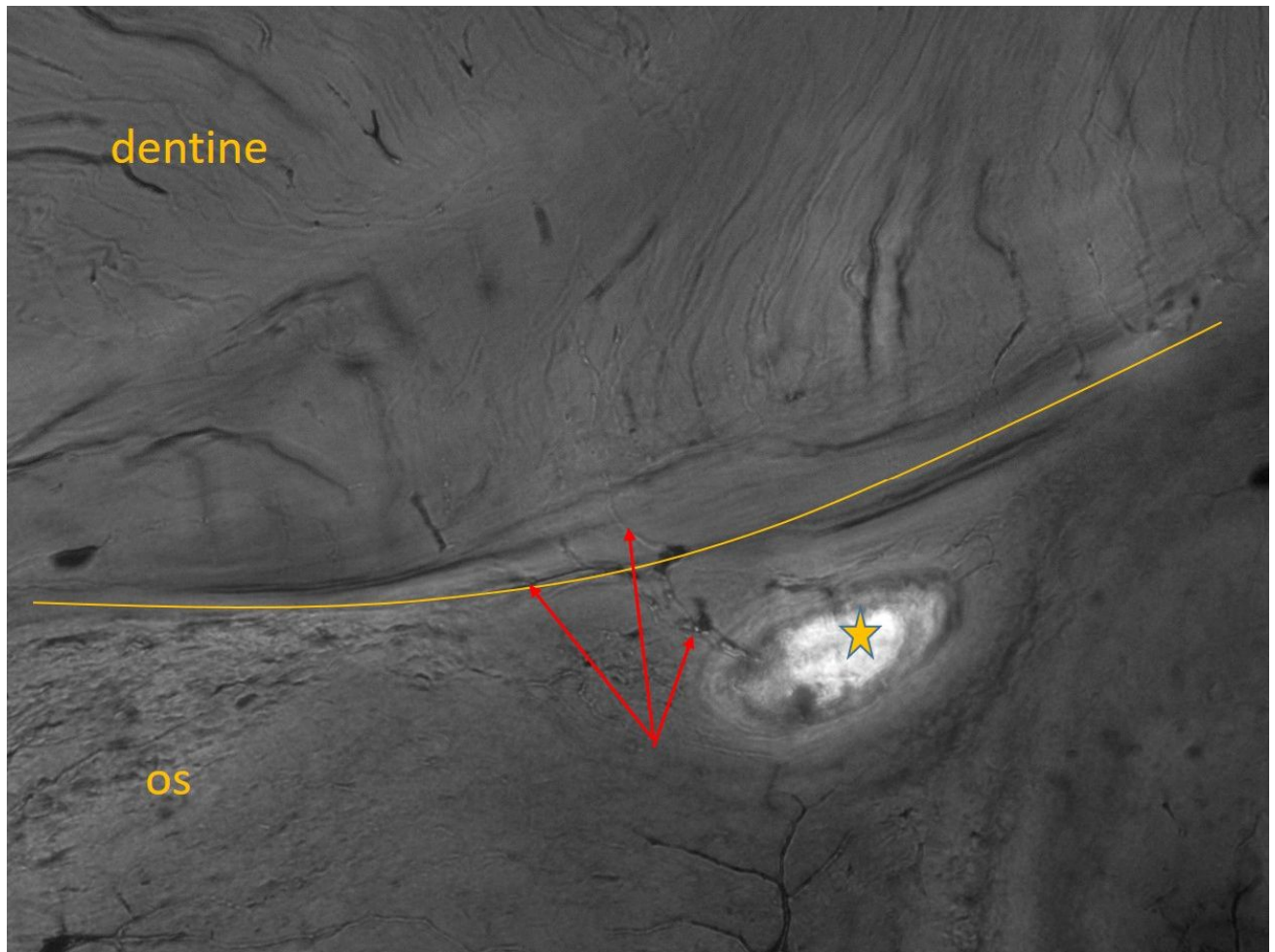


Figure 32 : Détail d'un odontode : canaliculus de Williamson issu d'un canal vasculaire (étoile orange) et dont les ramifications (flèches rouges) sont en connexion avec la dentine. La ligne orange marque l'interface entre la matrice osseuse et la dentine

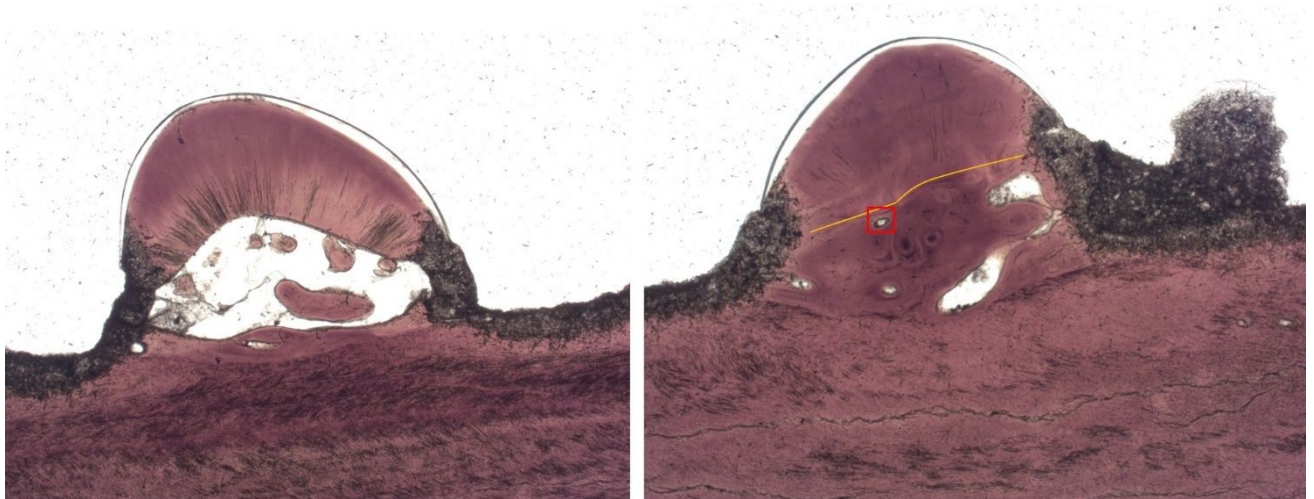


Figure 33 : Comparaison de deux odontodes. Dans celui de gauche on observe la cavité pulpaire tandis que dans l'odontode de droite cette dernière a été comblée par de la substance osseuse, et notamment l'interface avec la dentine (ligne orange). Quelques cavités vasculaires sont visibles. Le carré rouge correspond à la zone visualisée sur la Figure 32.

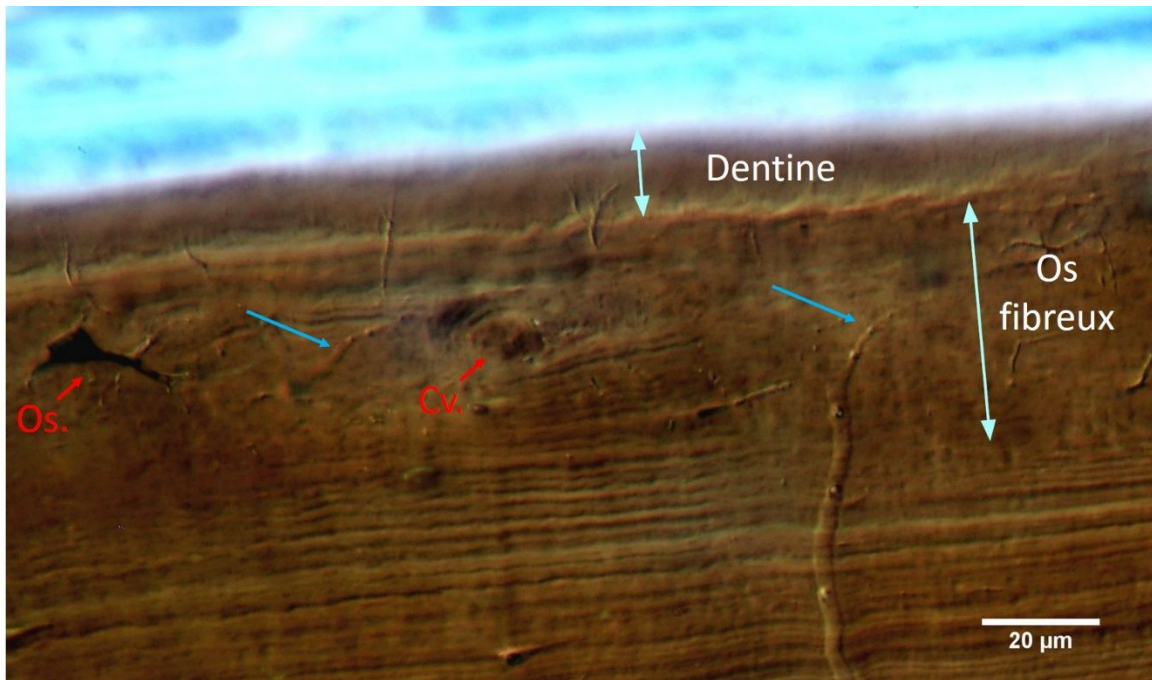


Figure 34 : *Lepidotes JRE.2008*. Détail de l'initium de la Figure 29. Succession d'une couche de dentine de 10 à 15 microns, puis d'os fibreux de 30 à 40 microns, puis d'os pseudo-lamellaire. Un canal vasculaire (Cv.) ainsi qu'un ostéocyte (Os.) sont visibles dans la couche d'os fibreux, ainsi que des extrémités de canaliculi de Williamson (flèches bleues)

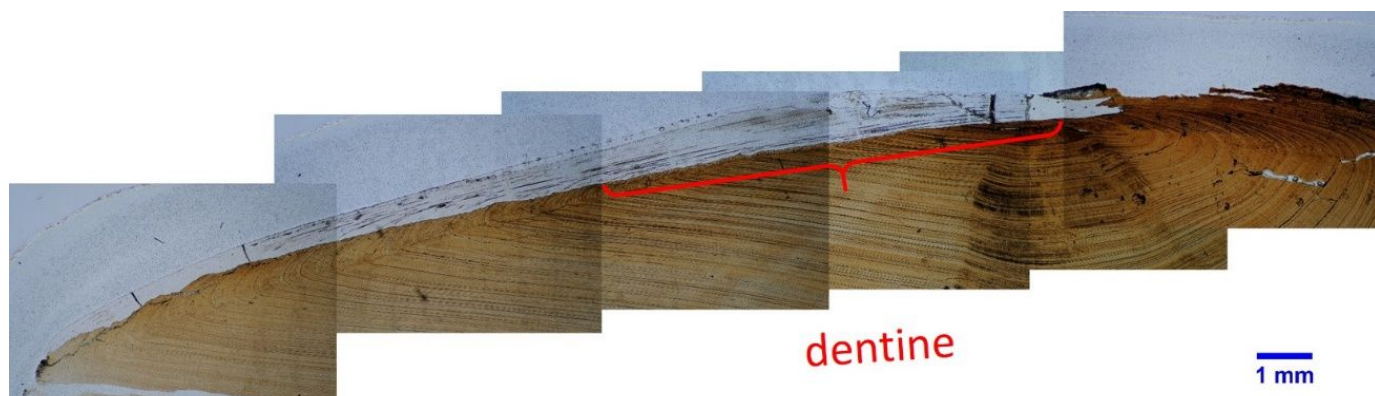


Figure 35 : Coupe longitudinale, du bord antérieur au bord postérieur, et passant par l'initium.

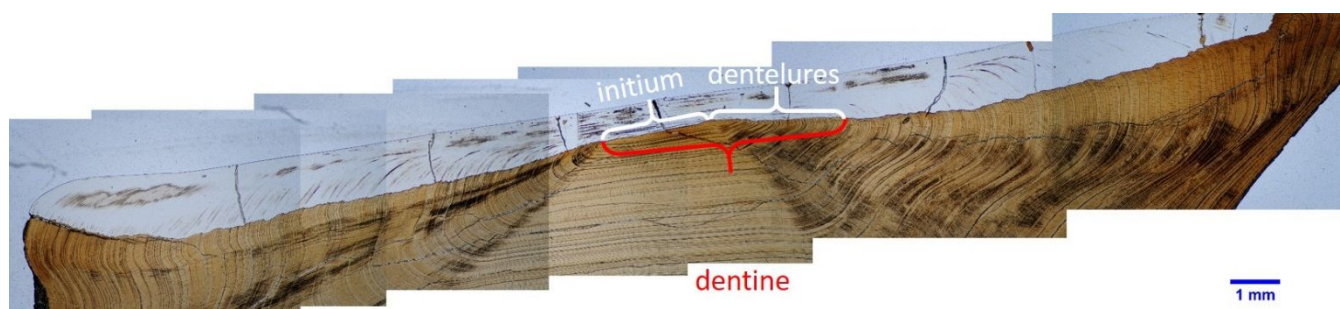


Figure 36 : Coupe transversale, du bord dorsal au bord ventral, et passant par l'initium.

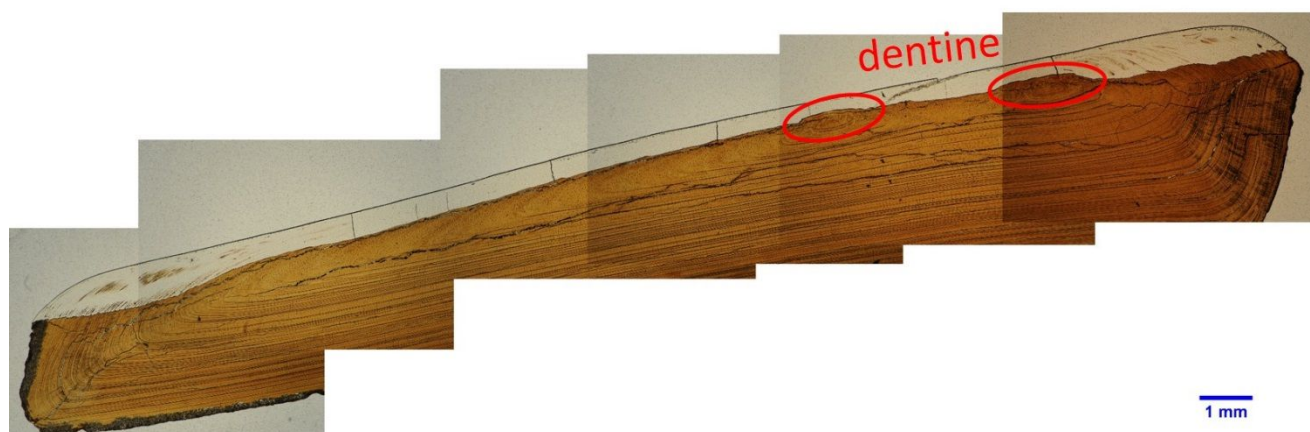


Figure 37 : Lepidotes JRE.2008. Coupe transversale près du bord postérieur de l'écaille. La partie ventrale est à gauche de l'image.



Figure 38 : *Lepidotes JRE.2008*. Petit os dermique avec 6 odontodes



Figure 39 : représentation schématique de la localisation de la dentine. Les rectangles orange correspondent à la localisation de la dentine sur une coupe longitudinale et une coupe transversale passant

par l'initium. Les deux ovales orange correspondent à la localisation de la dentine faite sur la coupe transversale figurée, qui a été réalisée selon la ligne rouge près du bord postérieur de l'écaille.

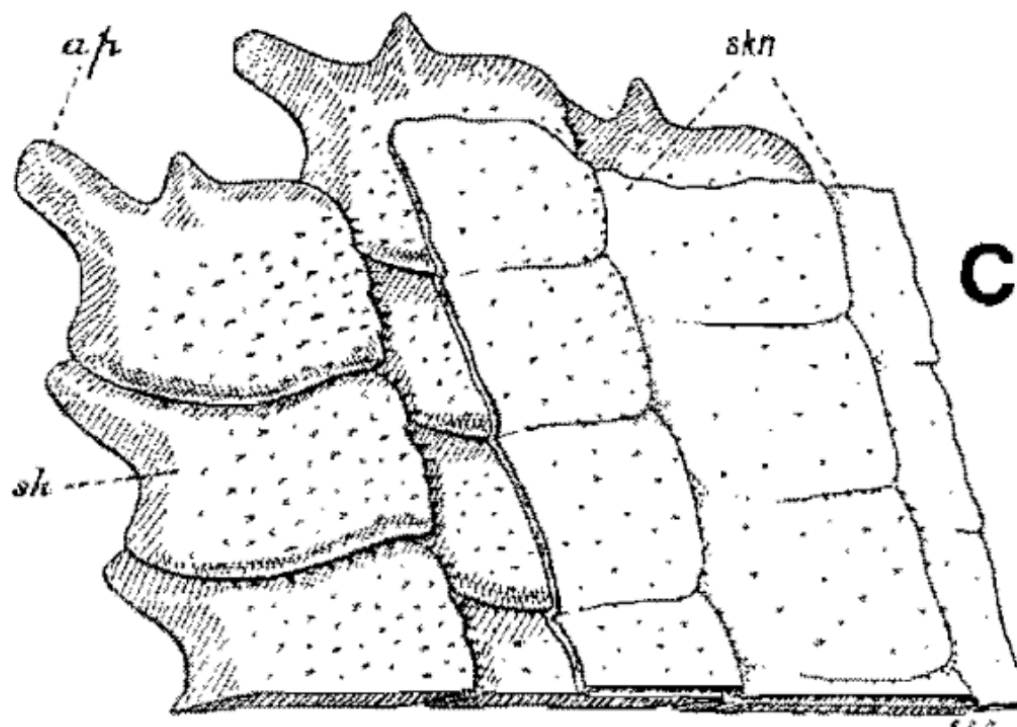


Figure 40 : Ecaillure de lépisostée recouvert de sa couche d'épiderme. Bord postérieur à droite et bord dorsal en haut. Pour chaque écaille les bords postérieur et ventral sont recouvrant, tandis que les bords antérieur et dorsal sont recouverts par les écailles adjacentes (dessin d'après (Francillon-Vieillot, et al., 1990)).

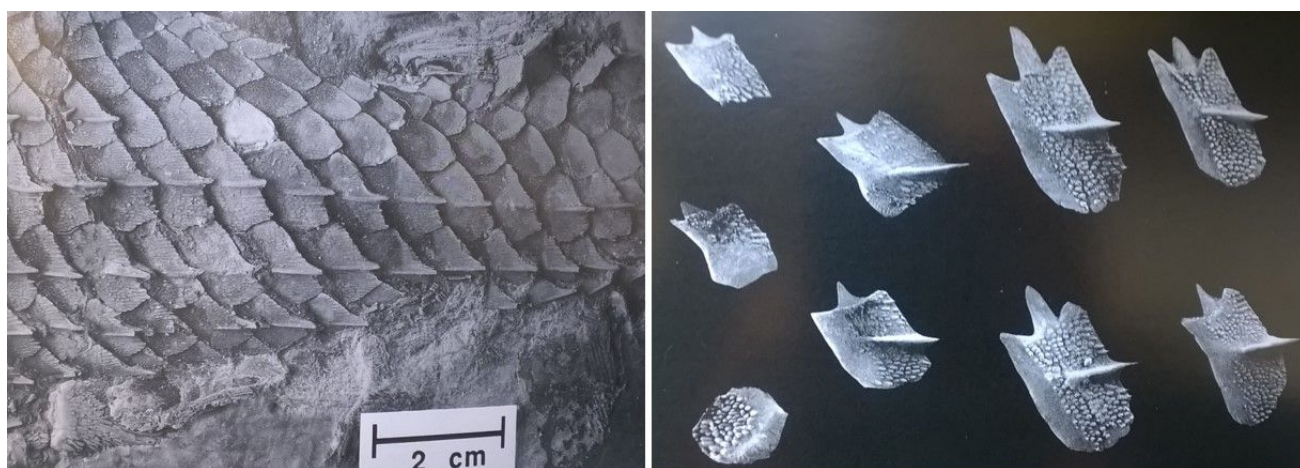


Figure 41 : Ornementation caractéristique d'*Obaichthys decoratus* (illustrations d'après (Grande, 2010)). Les crêtes sont alignées longitudinalement indépendamment de la forme des diverses écailles auxquelles elles appartiennent.

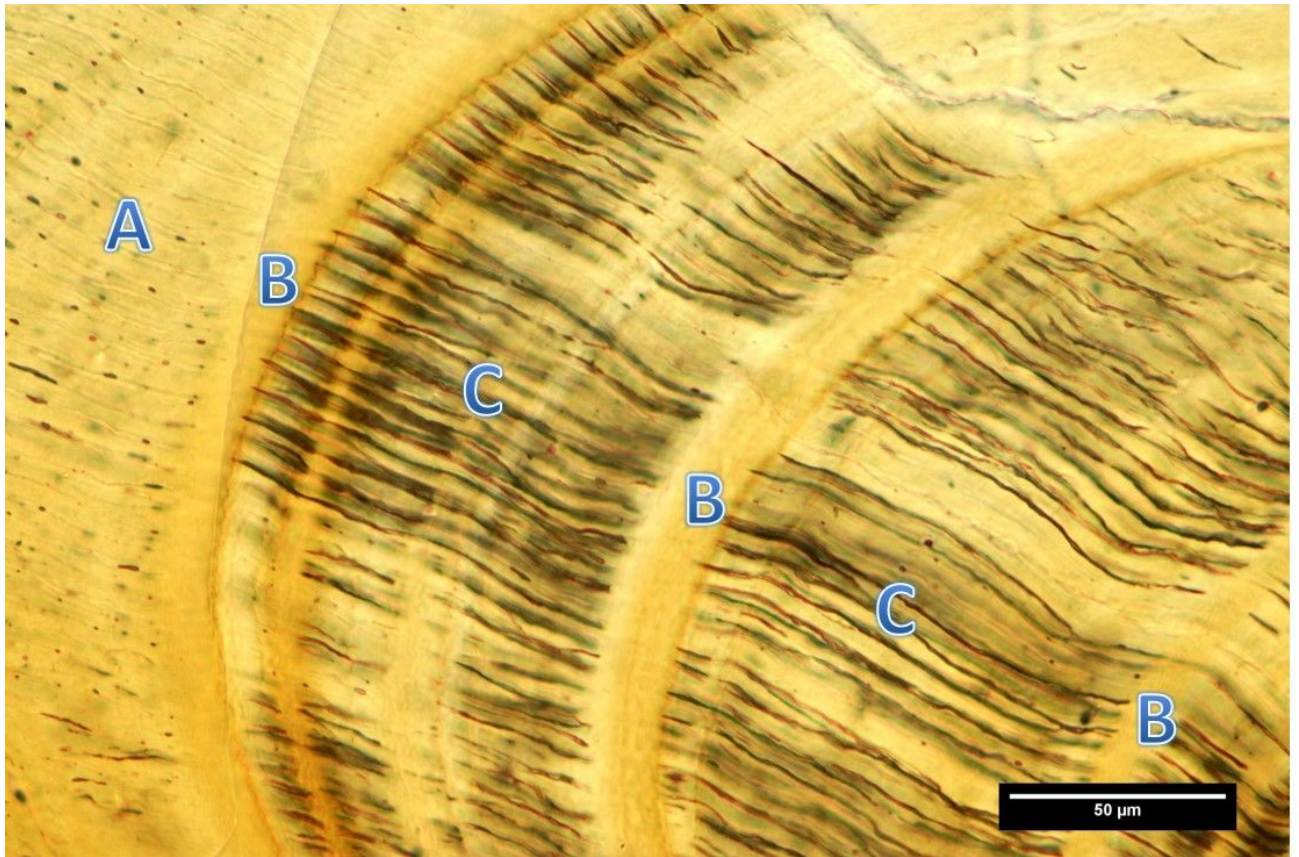


Figure 42 : Fibres de Sharpey en lumière transmise. Trois régions distinctes : région C où les fibres sont noires et ondulantes, région A où elles sont translucides et ondulantes, région B où elles ne sont pas apparentes.

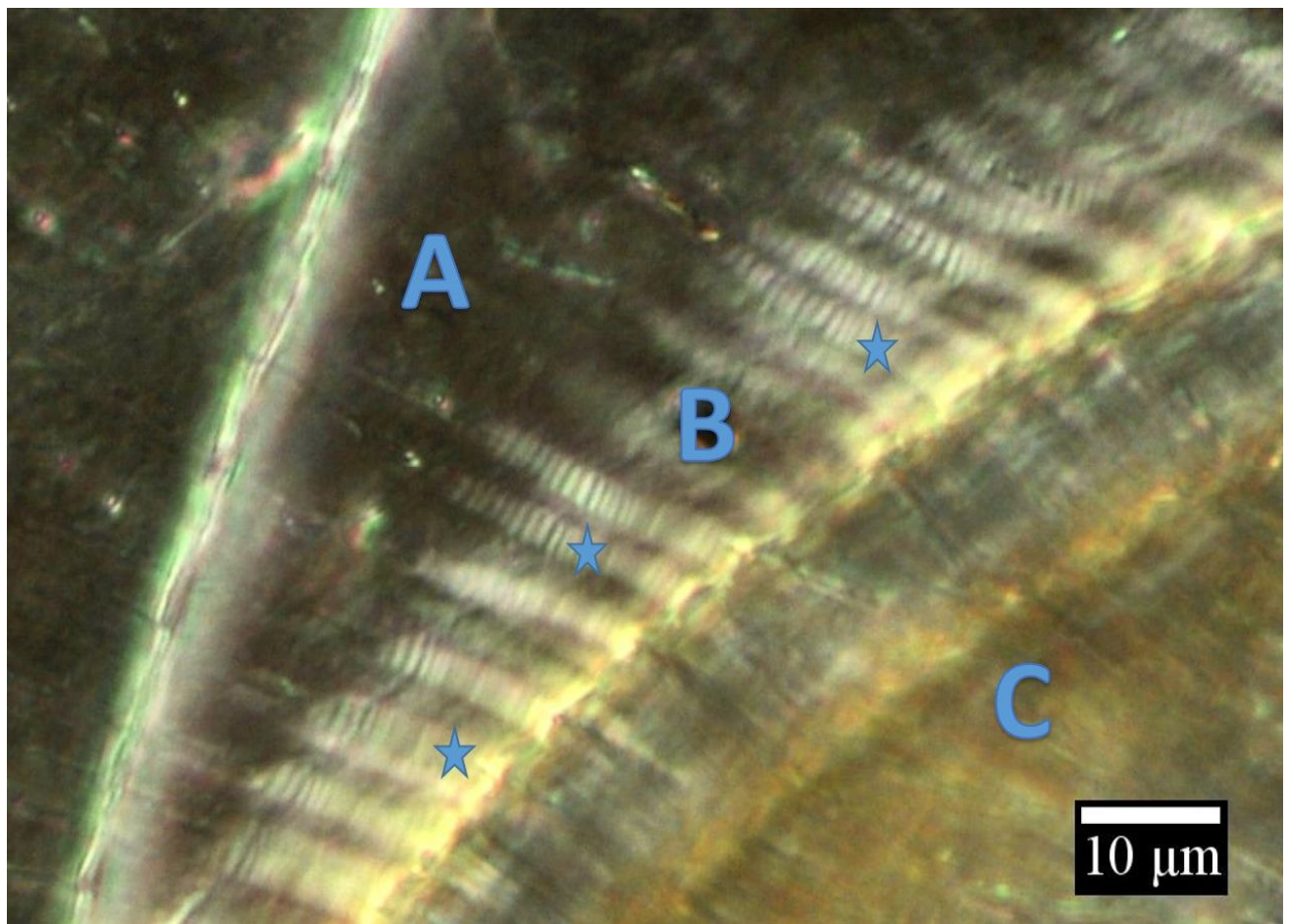


Figure 43 : Agrandissement de la région gauche de la Figure 42. Image en contraste interférentiel sous nicols croisés (D.I.C). Dans la région B les fibres de Sharpey minéralisées sont présentes sous la forme de bandes blanches striées d'environ 3 microns de large (étoiles) à cause de leur biréfringence.

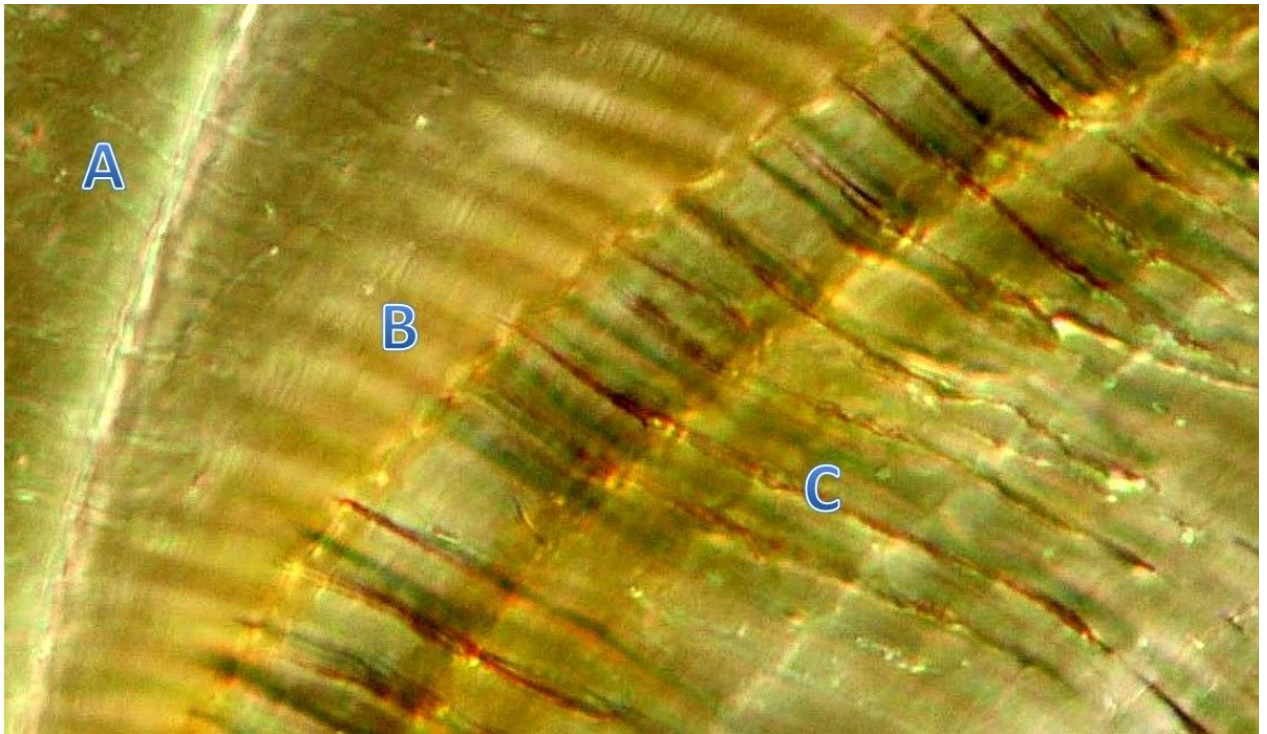


Figure 44 : Image composite réalisée à l'aide du logiciel ImageJ : superposition d'une image en lumière transmise et d'une image en D.I.C. Les fibres de Sharpey dans les régions B, présentes sous la forme de stries blanches apparaissent dans la continuité des fibres noires ondulantes de la région C, et également dans la continuité des fibres translucides de la région A.

Lumière polarisée –analysée (D.I.C.)

Lumière transmise

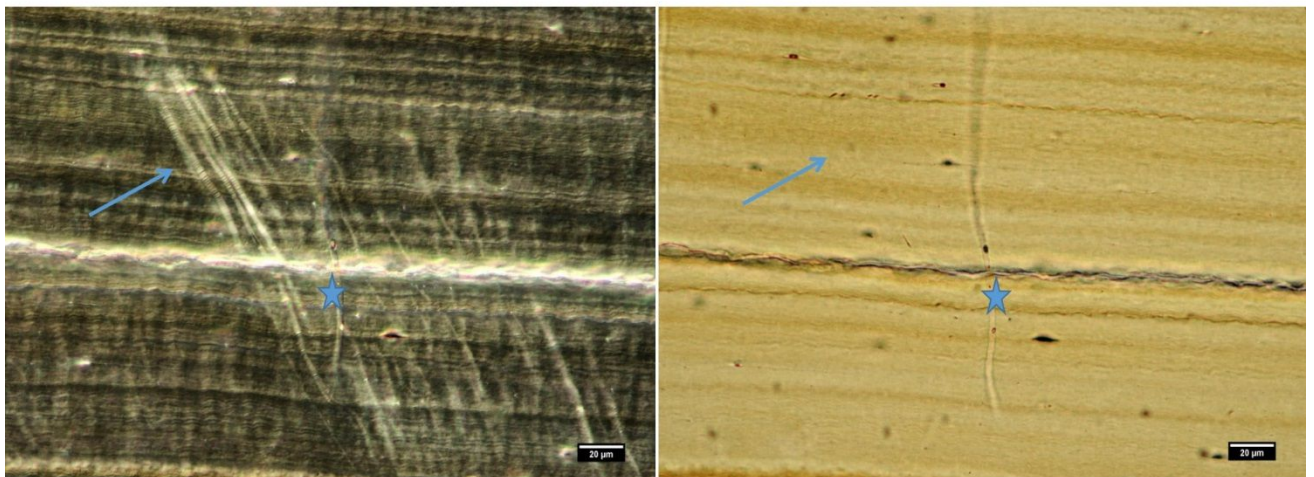


Figure 45 : Fibres de Sharpey en contraste interférentiel sous nicols croisés (D.I.C) à gauche, et en lumière naturelle à droite (champ clair). La flèche bleue correspond à l'emplacement d'une fibre de Sharpey "invisible" en lumière naturelle, mais présente sous la forme d'une bande blanche en lumière polarisée-analysée à cause de sa biréfringence. L'étoile correspond à un canaliculus de Williamson.

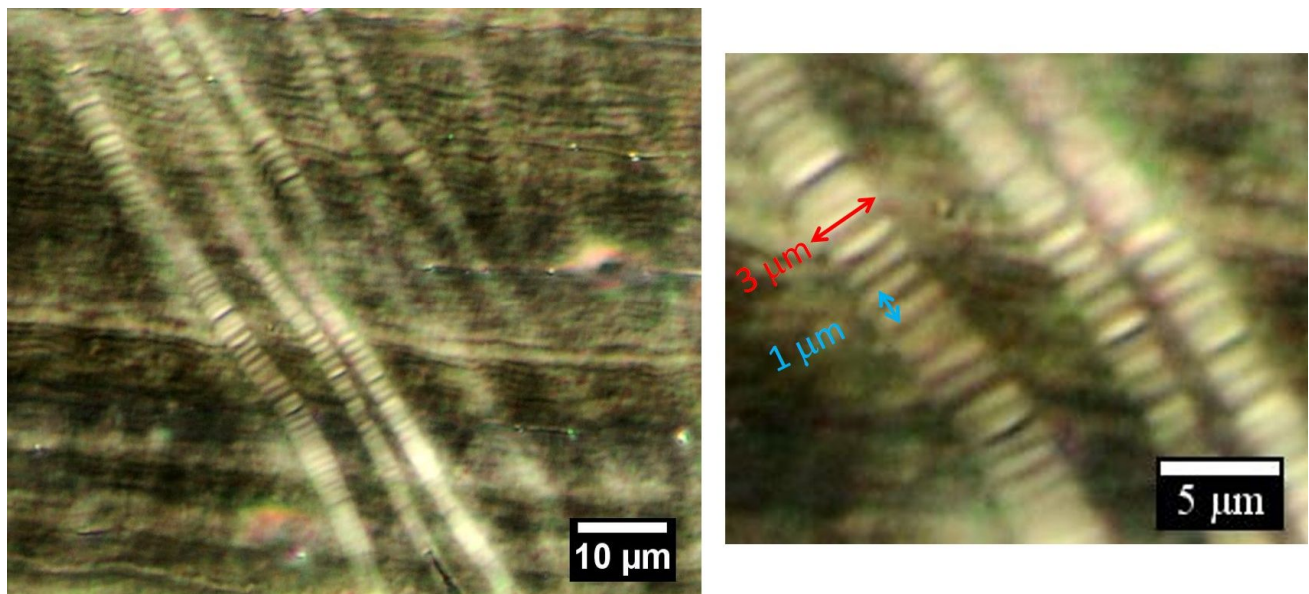


Figure 46 : Observation en DIC. Agrandissement de la Figure 45, afin de distinguer la structure fine présente sur les fibres de Sharpey minéralisées, consistant en des stries perpendiculaires à l'axe des fibres et distantes d'un micron environ.

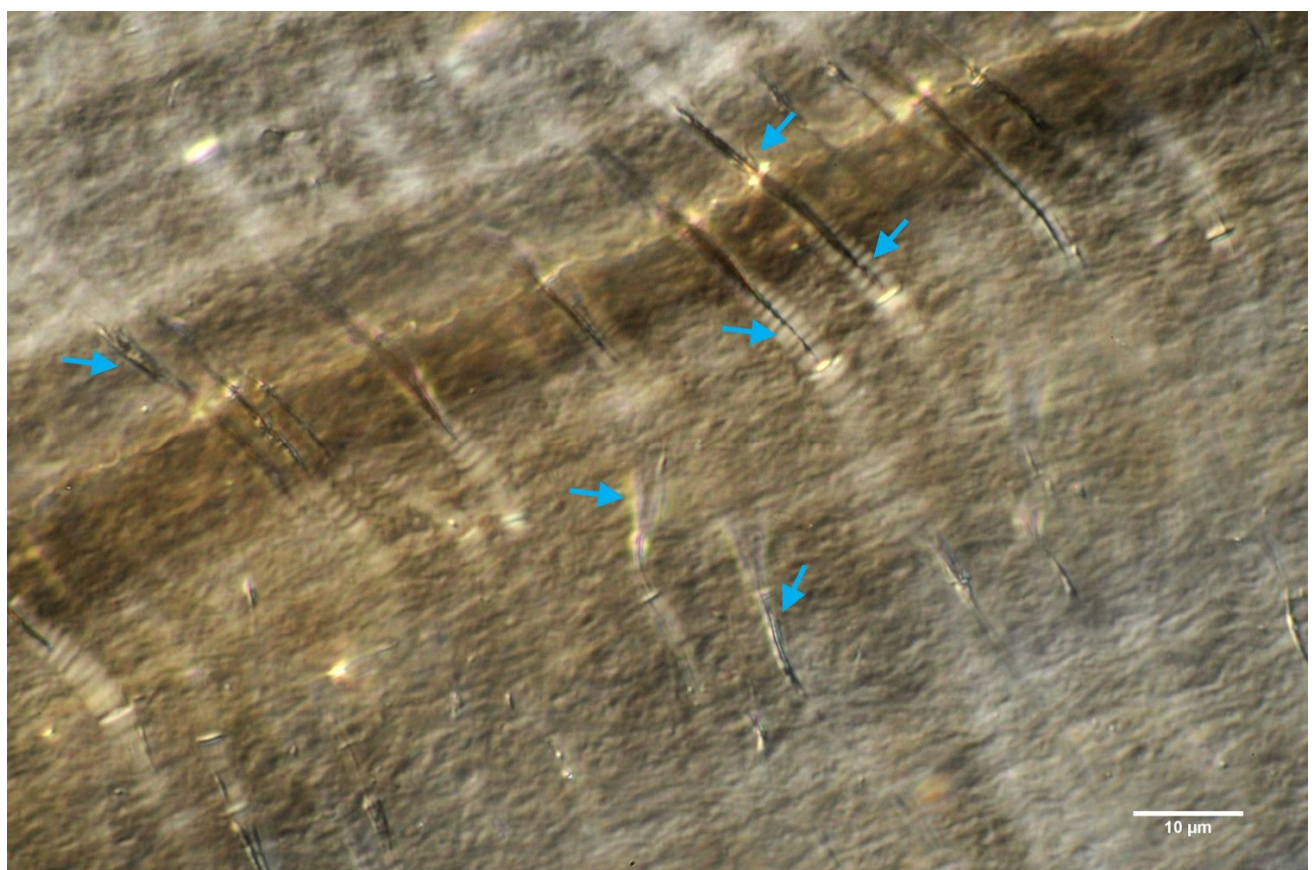


Figure 47 : Observation en DIC. Présence de fines fibrilles noires au sein des fibres de Sharpey partiellement minéralisées (flèches bleues).

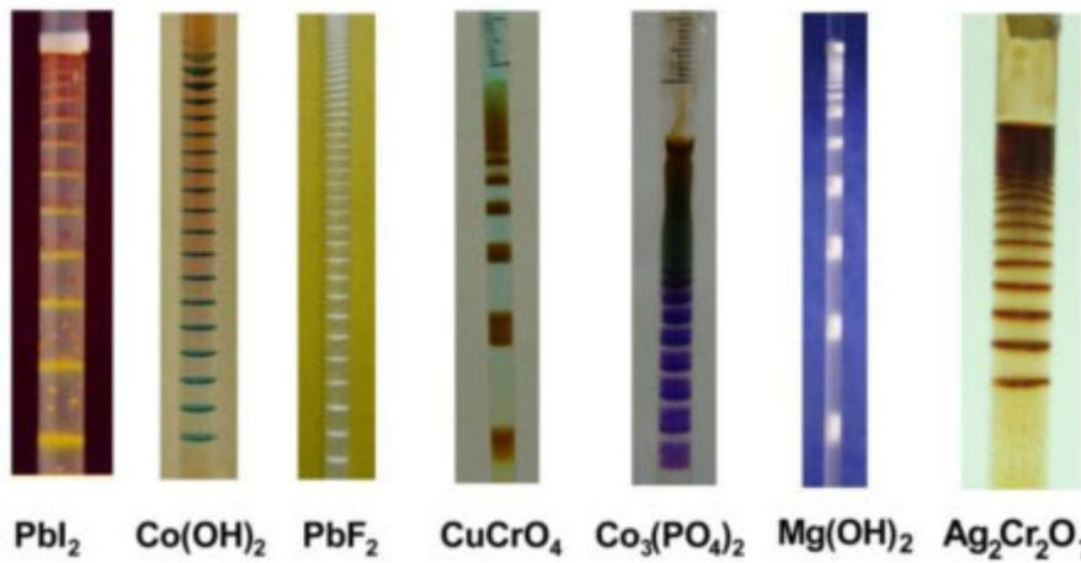


Figure 1: Typical Liesegang patterns grown in gels, for a number of sparingly soluble salts.

Figure 48 : Phénomène physico chimique de précipitations périodiques connu sous le nom de « Liesegang bands », figure d'après (Sultan, 2013).

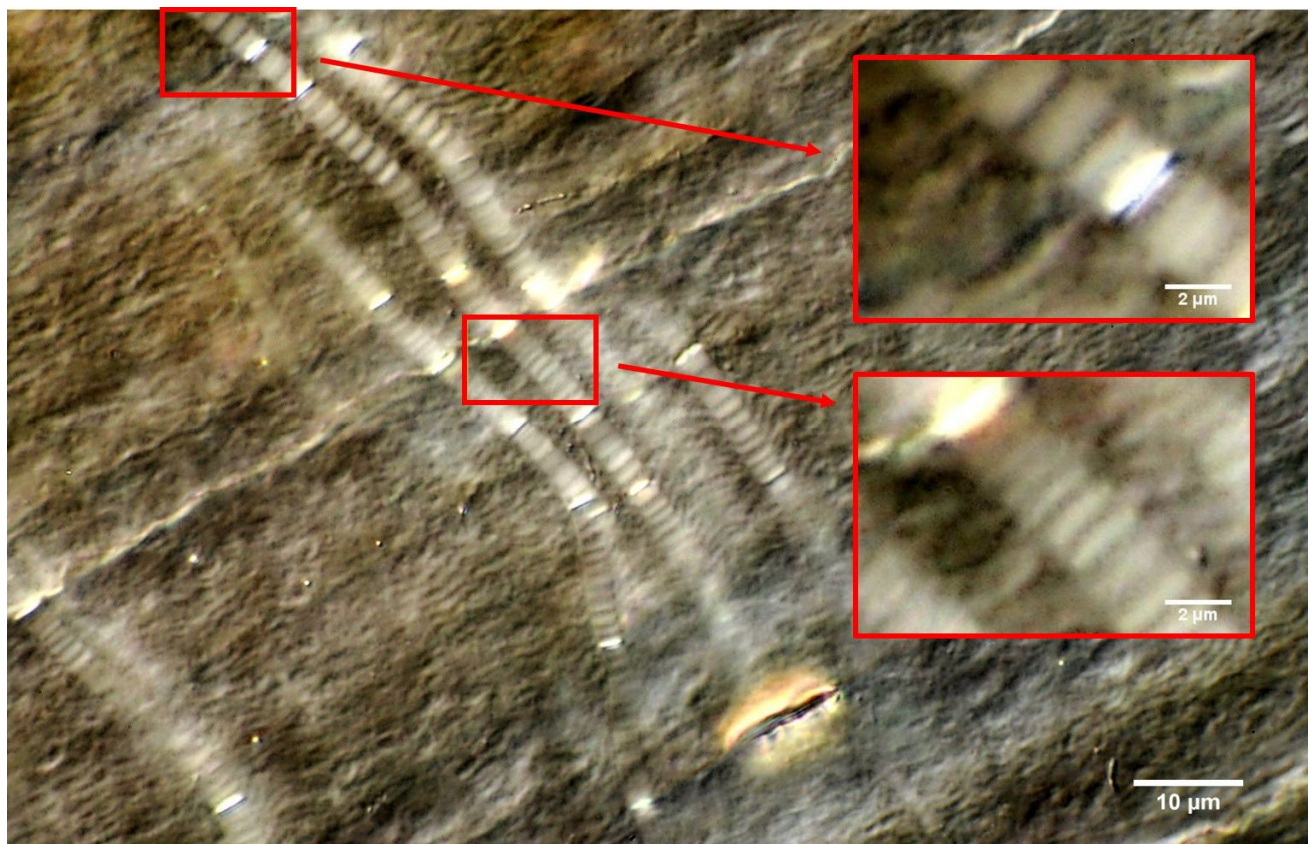


Figure 49 : Observation en DIC. Variation de la périodicité des stries sur une même fibre de Sharpey minéralisée selon les zones observées.

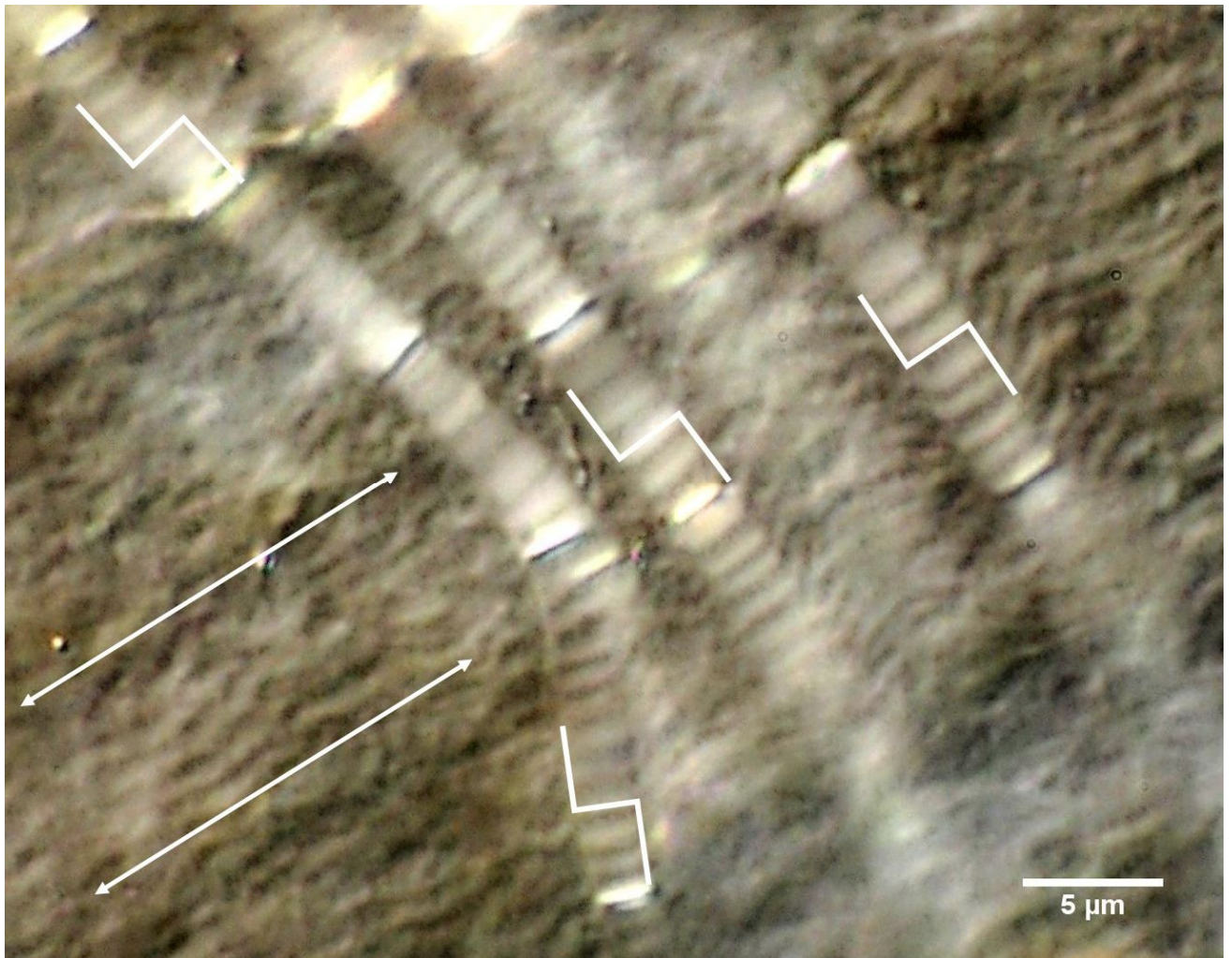


Figure 50 : Observation en DIC. Les stries sont toujours perpendiculaires à l'axe des fibres de Sharpey, indépendamment de la direction générale des fibres intrinsèques environnantes, indiquées par la double flèche blanche

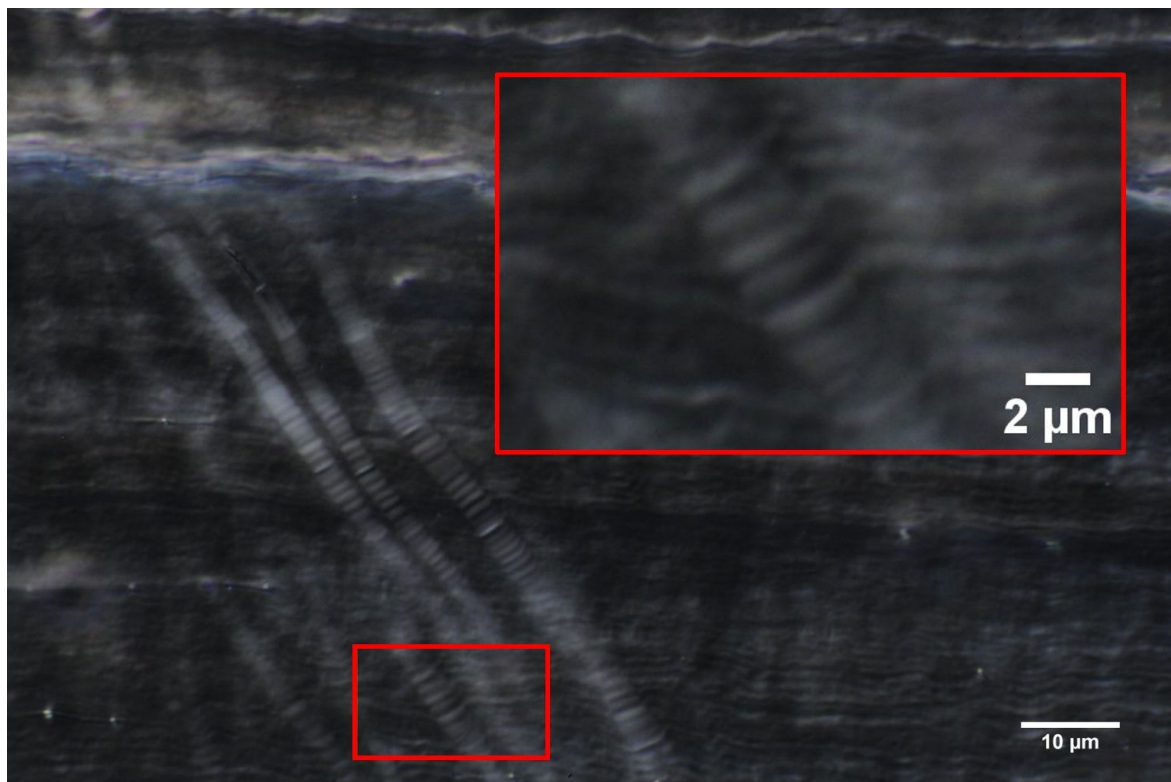


Figure 51 : Observation en DIC. Il semble exister une continuité entre les stries sur les fibres de Sharpey minéralisées et les fibres intrinsèques adjacentes

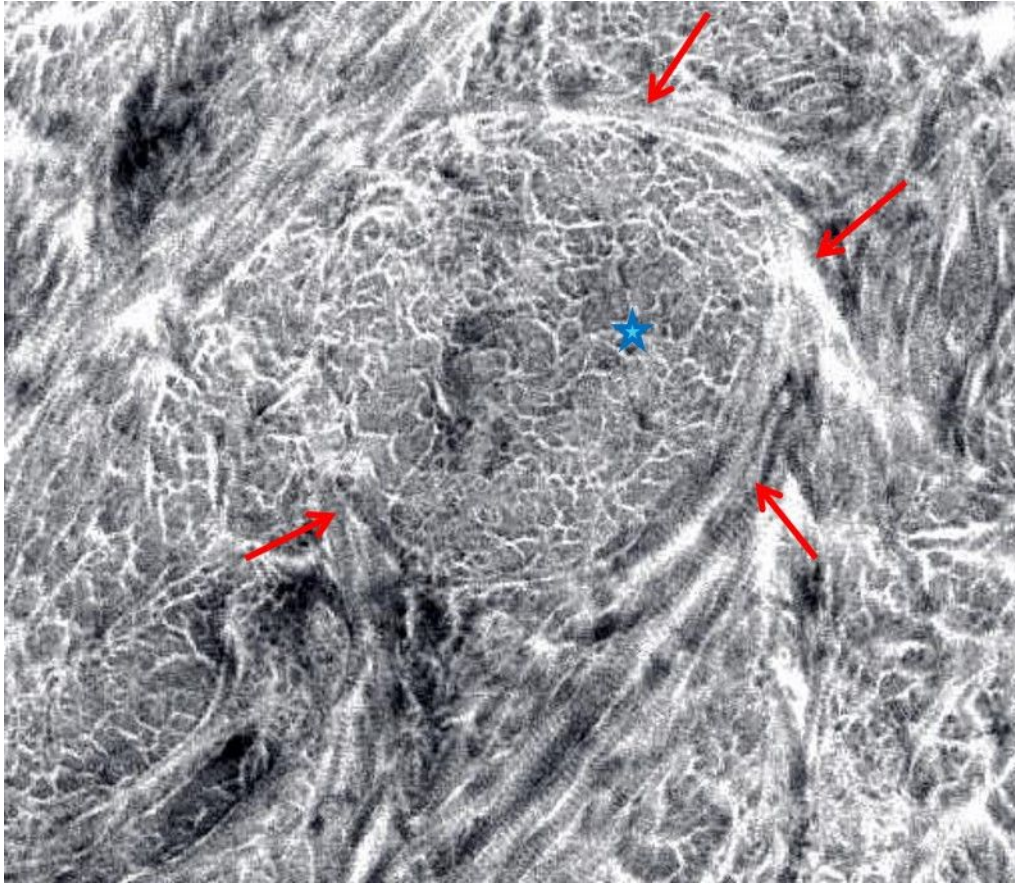


Figure 52 : Observation au MET –Thèse Damien SUBIT de 2004. Enroulement des fibrilles de collagène (flèches rouges) autour d'amas (*) qui correspondent à des paquets de fibrilles de collagène, donc à des fibres de collagène orthogonales coupées transversalement.

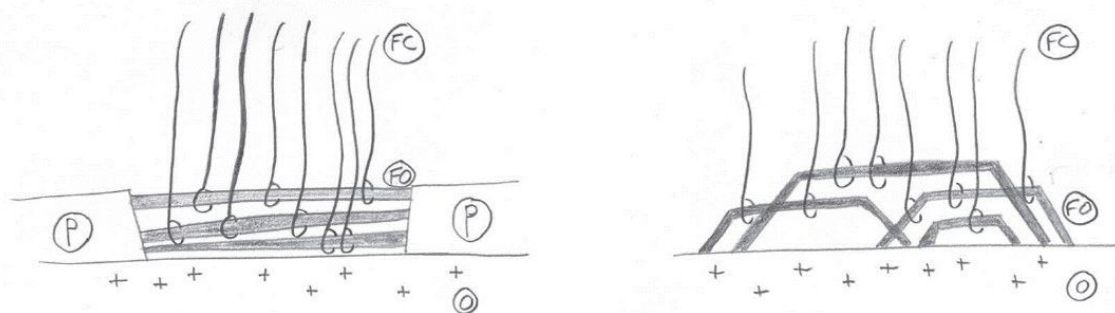


Fig. 4.17 - Hypothèses sur l'attache des fibres orthogonales. Les fibrilles de collagène s'enroulent autour des fibres orthogonales qui pourraient s'insérer dans le périoste (gauche) ou dans l'os (droite). P : périoste, O : os, FO : fibres orthogonales, FC : fibres de collagène.

Figure 53 : Thèse de >Damien Subit. Hypothèse d'un mécanisme d'attache des fibres orthogonales.

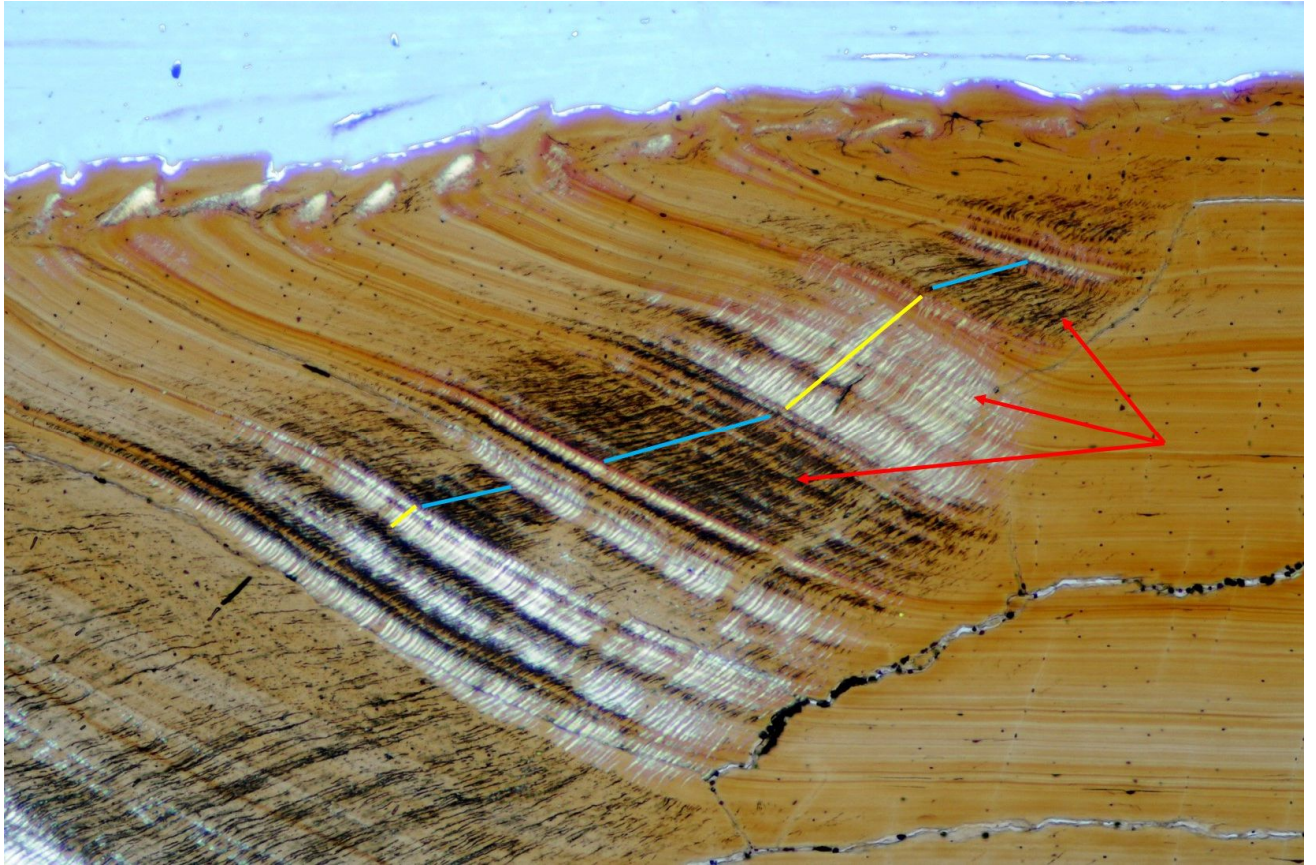


Figure 54 : Image composite, superposition d'une observation en lumière naturelle et en D.I.C sous analyseur et polariseur croisés. Changement d'orientation des fibres de Sharpey entre les régions où elles ne sont pas minéralisées (fibres noires) et les régions où elles sont minéralisées (fibres blanches)

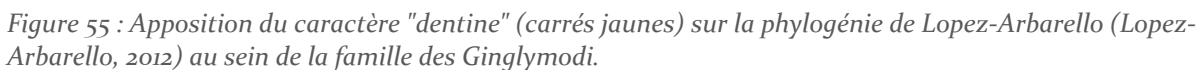




Figure 56 : Peel en cour de séchage sur la couverture écailleuse d'un lépisostée actuel conservé dans de l'alcool

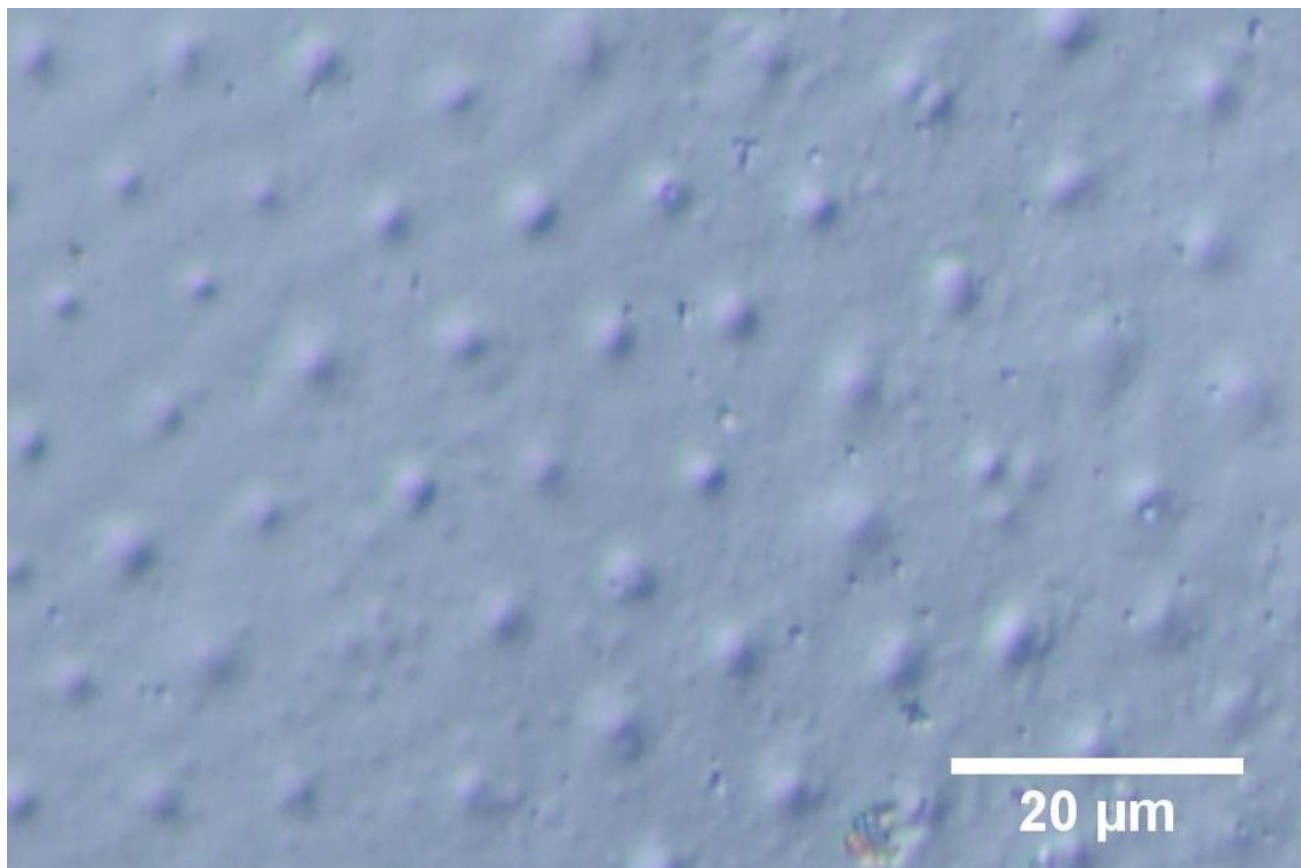


Figure 57 : observation d'un peel de Polypterus ornatipinnis au grossissement x20 en contraste interférentiel (M.O.)

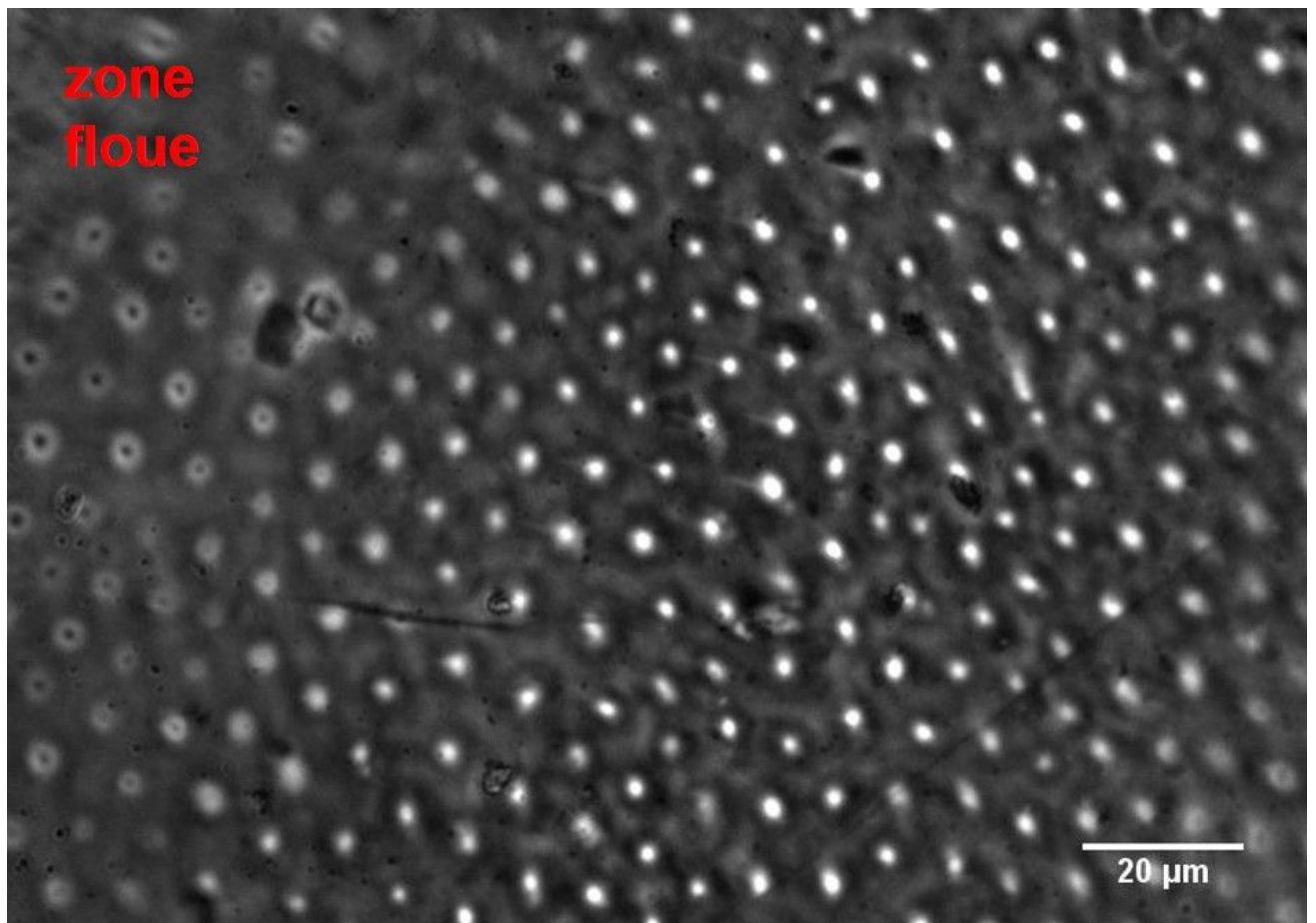


Figure 58 : Peel d'*Erpetoichthys callabaricus* observé en contraste de phase selon Zernike

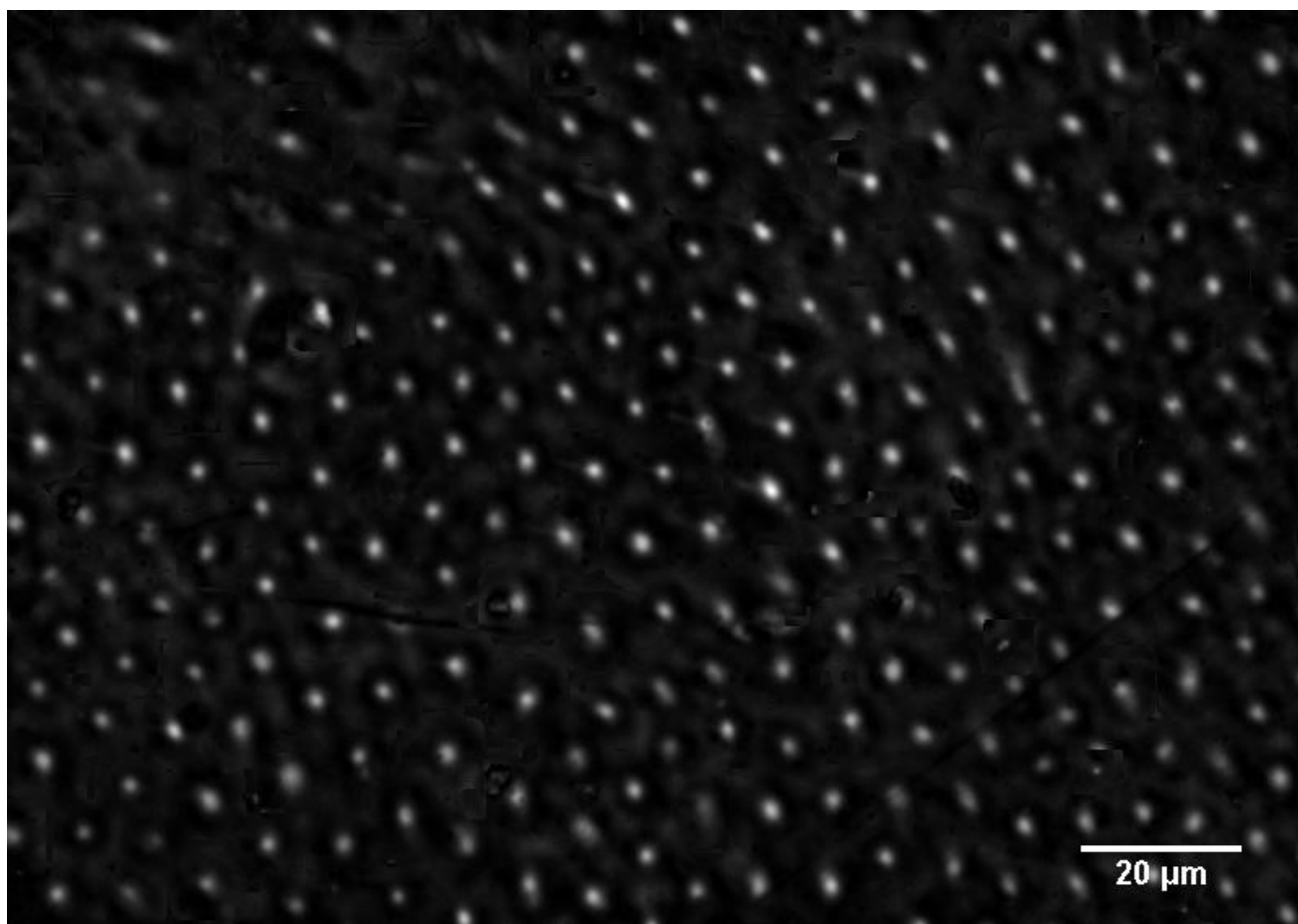


Figure 59 : Peel d'*Erpetoichthys callabaricus*, utilisation d'une piles d'images réalisées avec différentes mises au point et de la macro stack focuser pour améliorer la netteté sur tout le champ d'observation correspondant à l'image de la Figure 58.

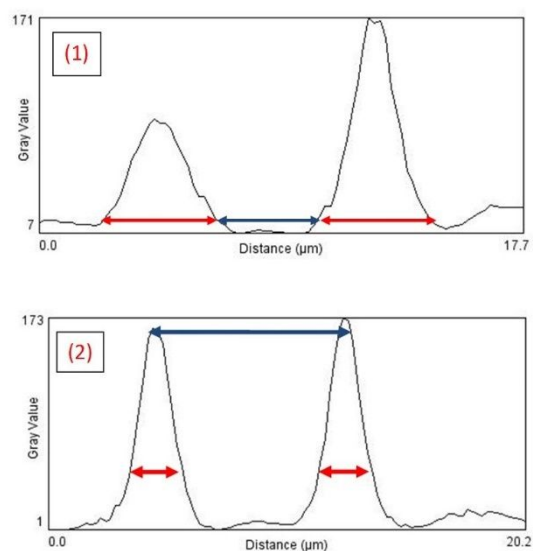
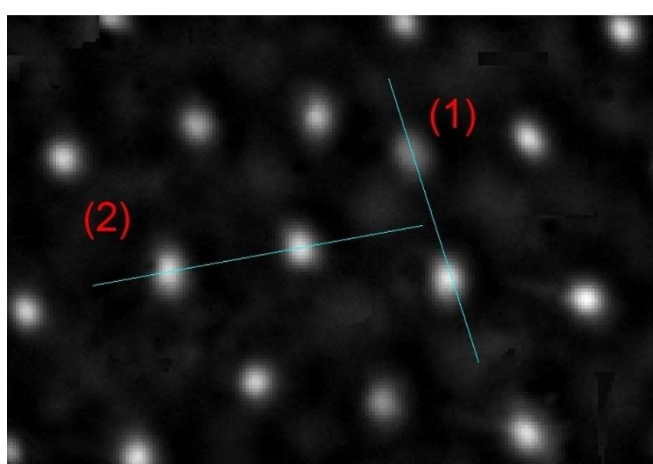


Figure 60 : Mesure manuelle des diamètres (double flèche rouge) et distances (double flèche bleue) entre microtubercules en accord avec les déterminations de Gayet (1) et selon les nouveaux descripteurs que nous proposons pour le traitement semi-automatisé des images (2)

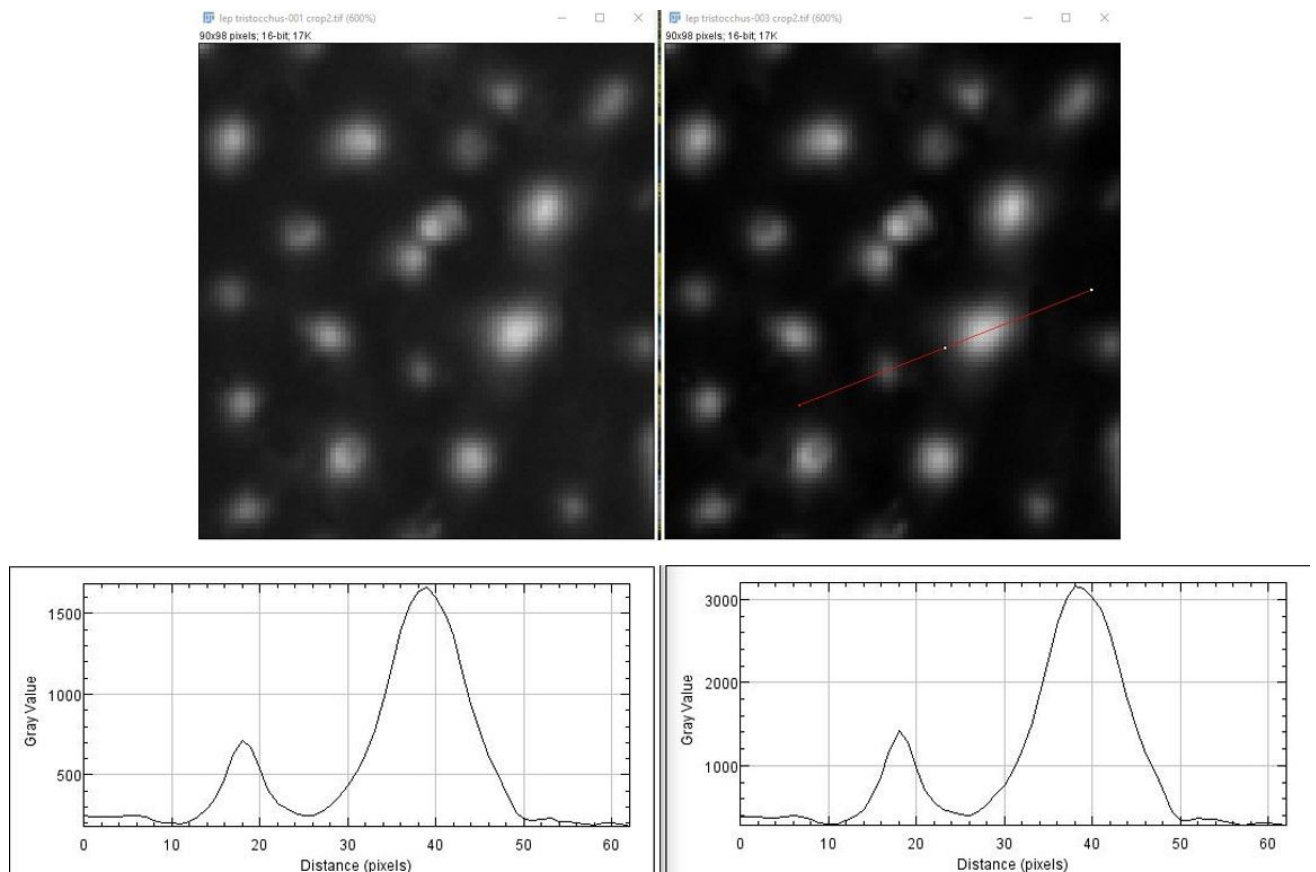


Figure 61 : L'image de gauche a été prise avec un temps d'acquisition de 50ms, tandis que l'image de droite a été prise avec un temps d'acquisition de 150ms. Bien que les valeurs absolues de niveaux de gris soient différentes, les proportions sont conservées au niveau des profils d'intensité caractérisant les microtubercules sur ces deux images.

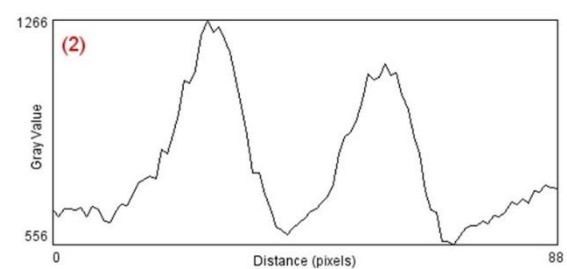
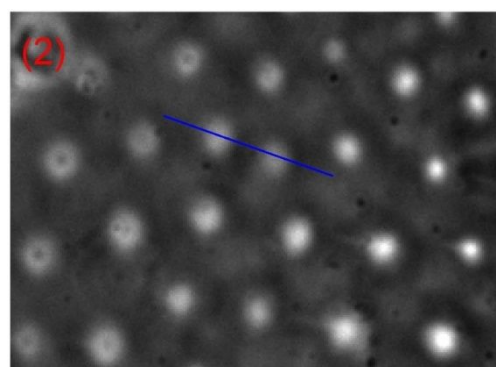
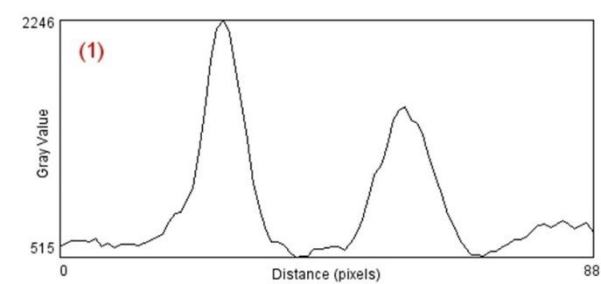
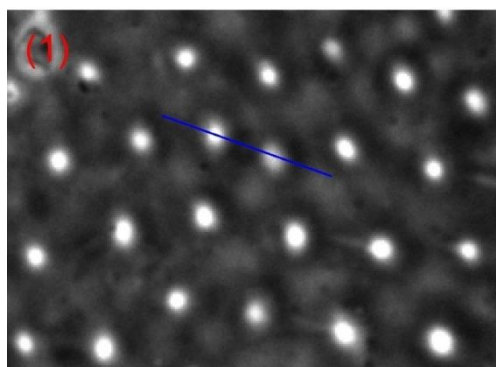


Figure 62 : Image (1) prise avec une mise au point correcte et image (2) où la mise au point a été réalisée à un autre endroit du peel. Les diamètres des tubercules sont artificiellement élargis quand la mise au point n'est pas correcte.

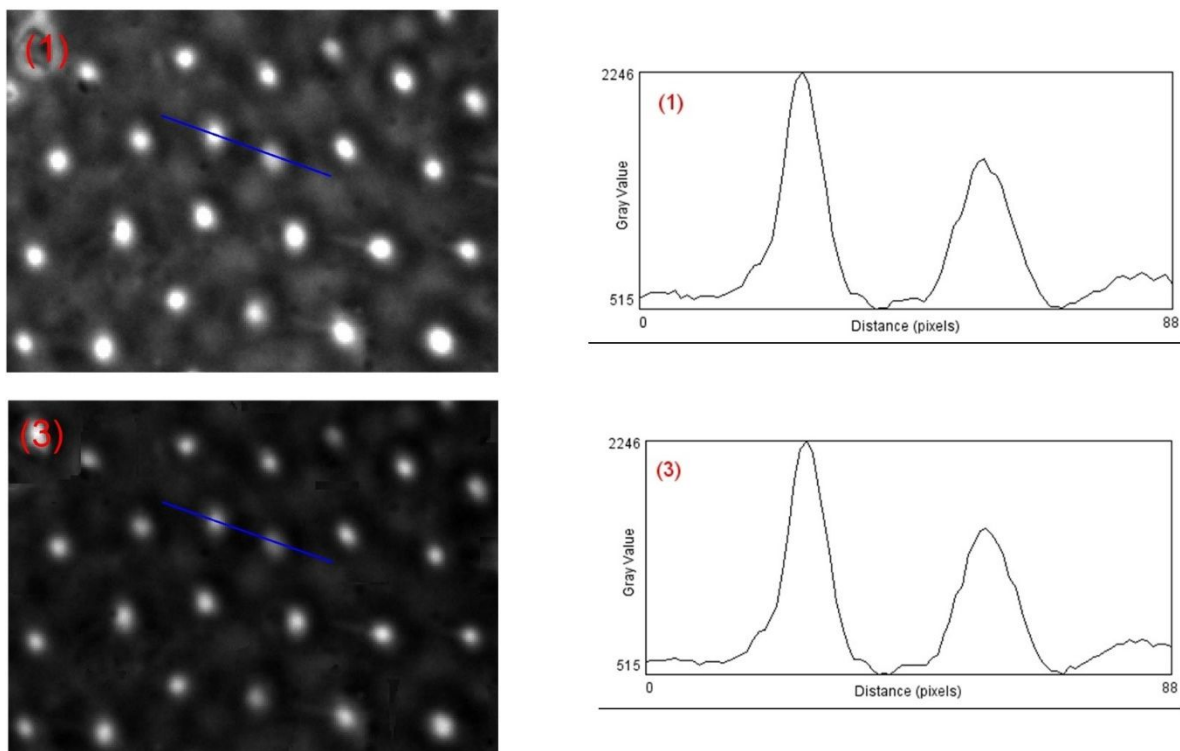


Figure 63 : Image (3) correspond à une image composite issue d'une pile d'images réalisées avec différentes mises au point selon Z et traitées avec le plugin « stack focuser ». Les profils d'intensité et les diamètres des tubercules de l'image (3) correspondent à ceux de l'image (1) où la mise au point a été faite localement.

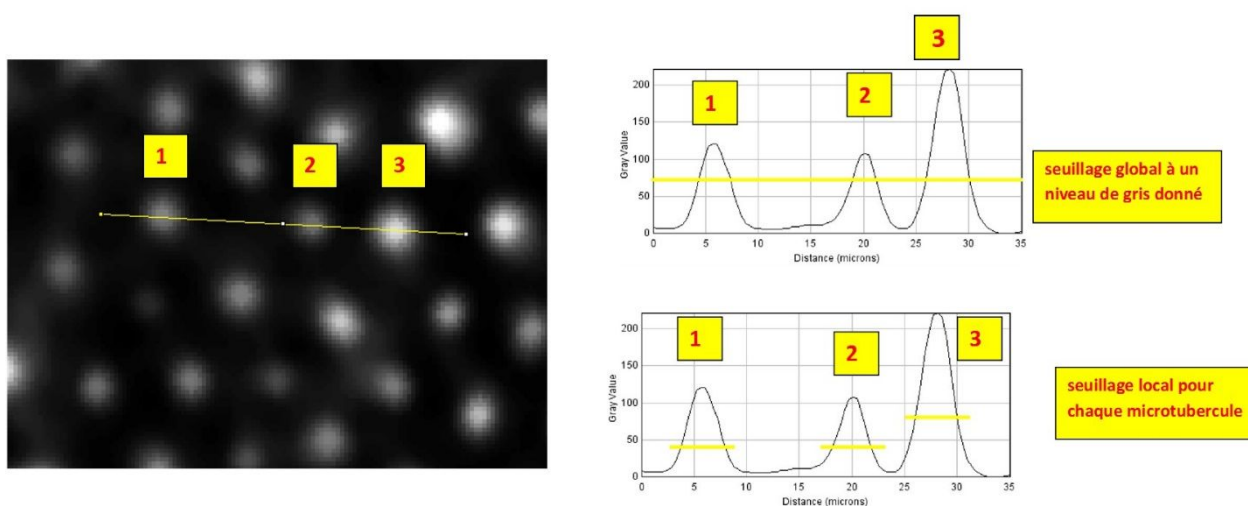


Figure 64 : Microtubercules seuillés de manière globale avec le même niveau de gris donné, ou bien de manière locale avec un niveau de gris adapté pour chaque tubercule et correspondant au tiers de l'intensité lumineuse de son maximum

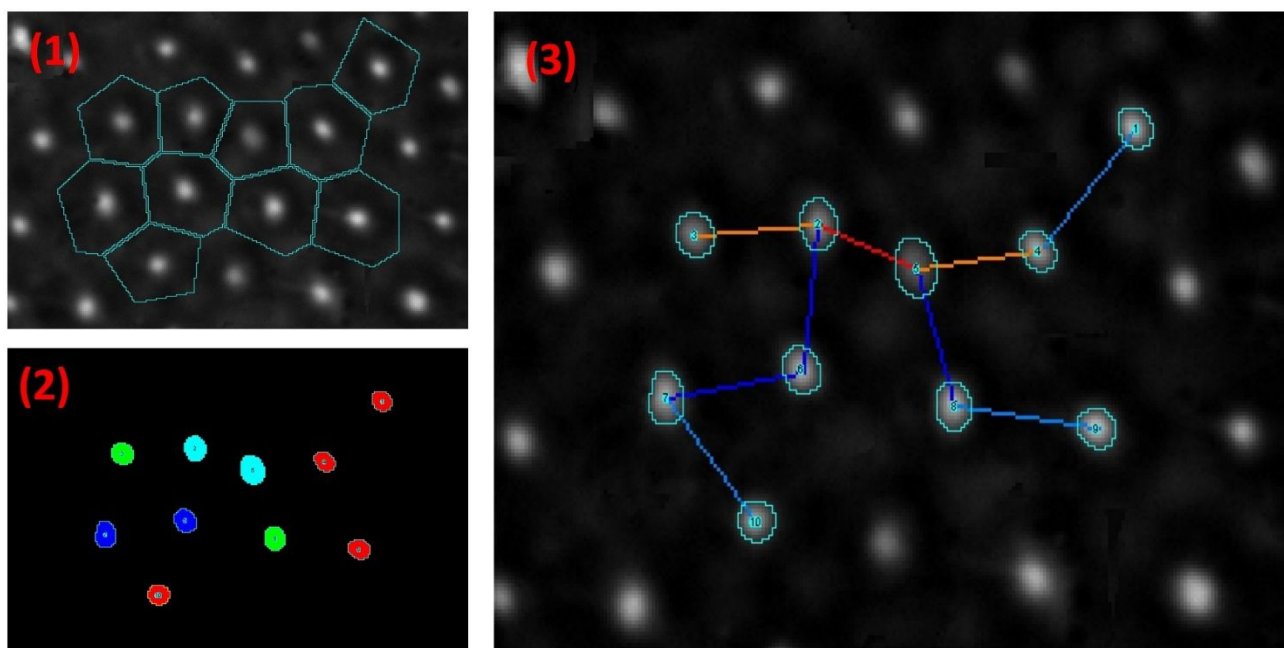


Figure 65 : Différentes étapes de mesure semi-automatique des diamètres et distances entre microtubercules. Etape 1 : pavage de Voronoï autour de chaque microtubercule. Etape 2 : Seuillage local de chaque tubercule et mesure de son diamètre. Etape 3 : calcul du plus proche voisin de chaque tubercule et mesure des distances entre les centres des plus proches voisins.

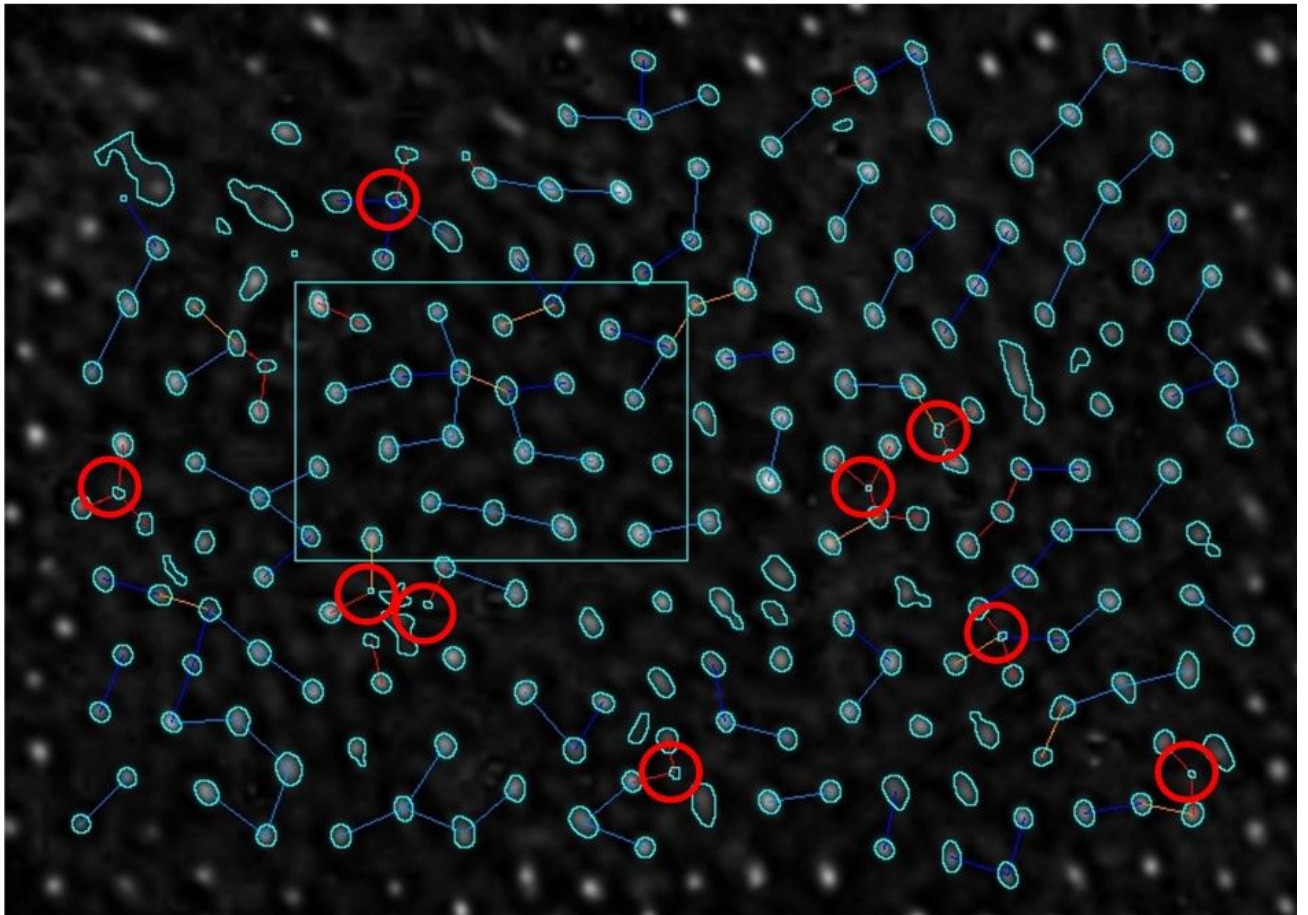


Figure 66 : traitement selon mon protocole d'un plus grand champ d'observation. Sont comptabilisés de manière automatique les dimensions et distances des microtubercules reliés entre eux par un trait. Les cercles rouges correspondent à des artéfacts de seuillage. Ces objets qui ne représentent pas des microtubercules sont à éliminer de manière manuelle. Le rectangle bleu correspond au champ d'observation réduit de la Figure 65.

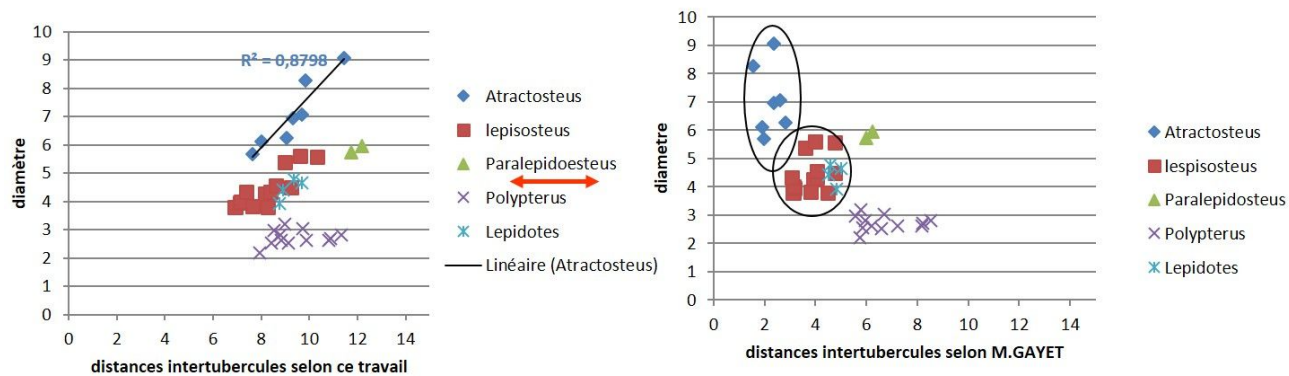


Figure 67 : Comparaison de la distance entre microtubercules en choisissant de mesurer la distance entre les sommets des microtubercules (ce travail) ou bien la distance séparant leur base (d'après Gayet et Meunier, 2001).

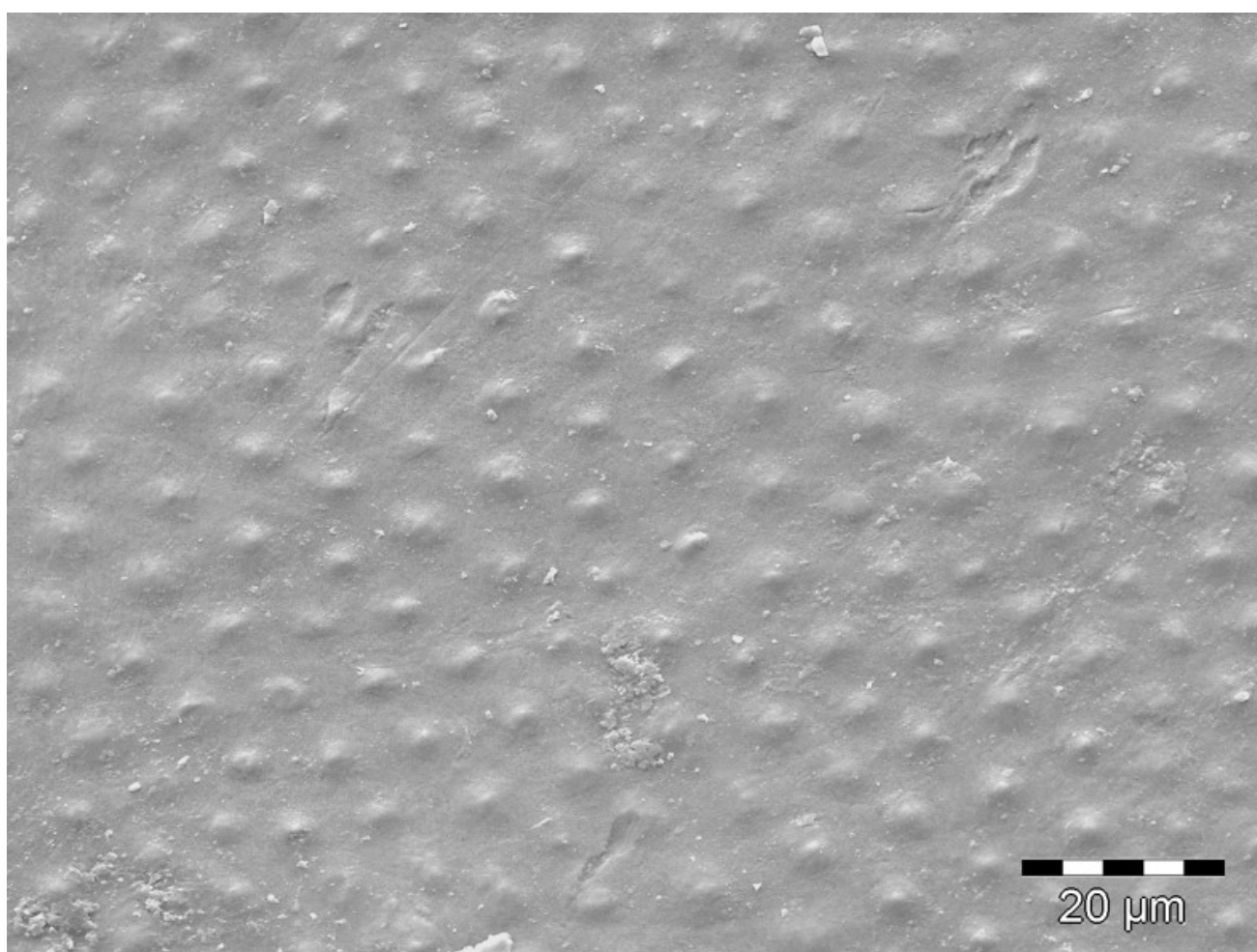


Figure 68 : Image de l'ornementation des microtubercules prise au Microscope Electronique à Balayage (MEB)

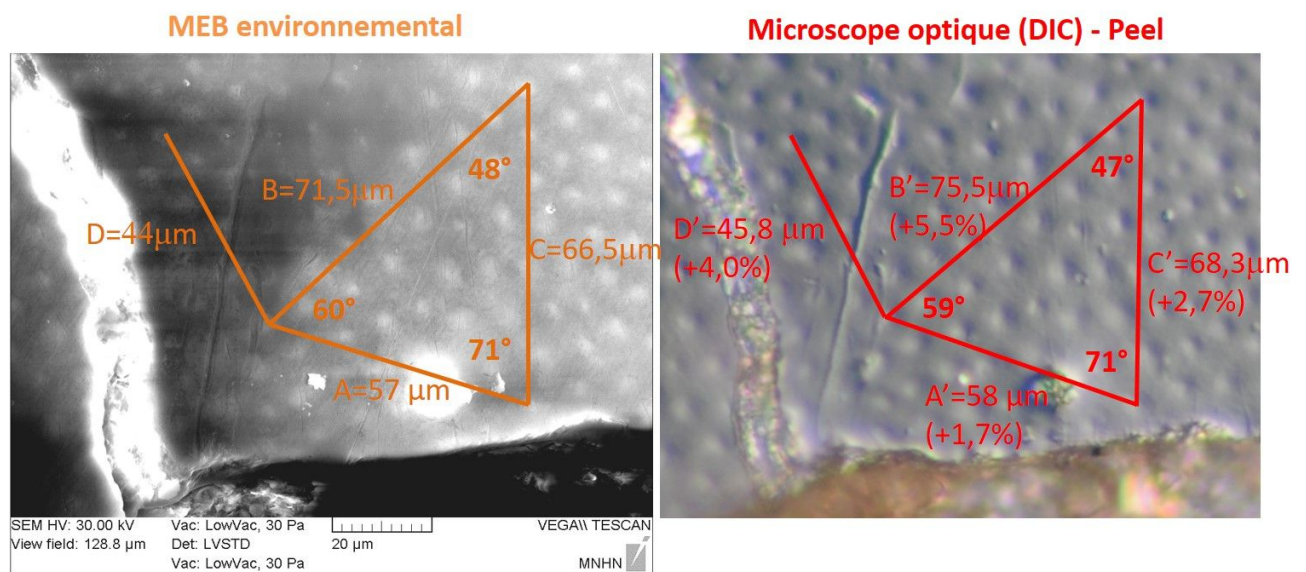


Figure 69 : Comparaison de l'ornementation d'une même zone d'une écaille observée directement au microscope électronique à balayage (MEB) et en microscopie optique après réalisation d'une réplique de la surface (peel).

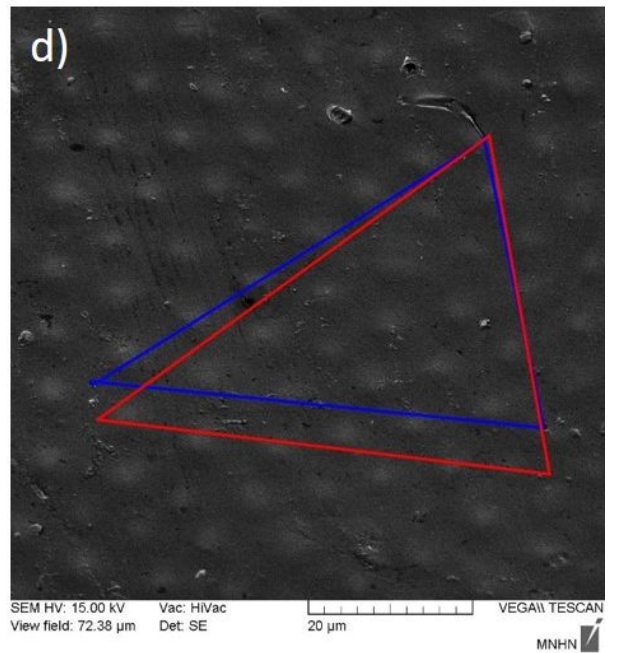
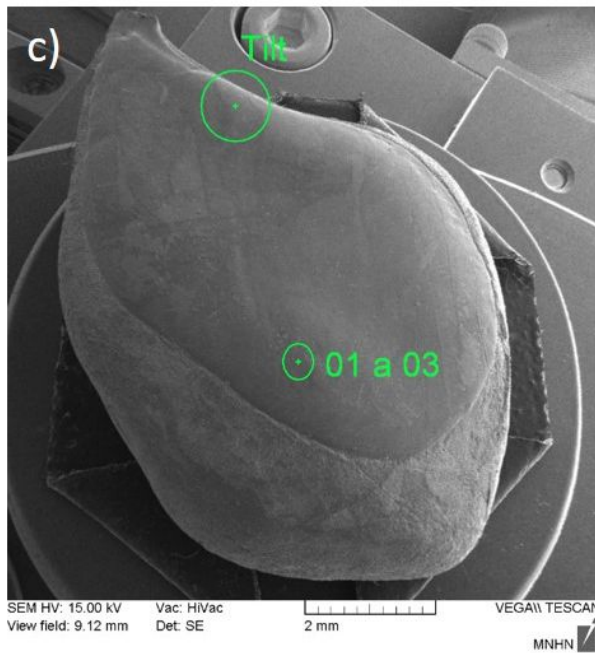
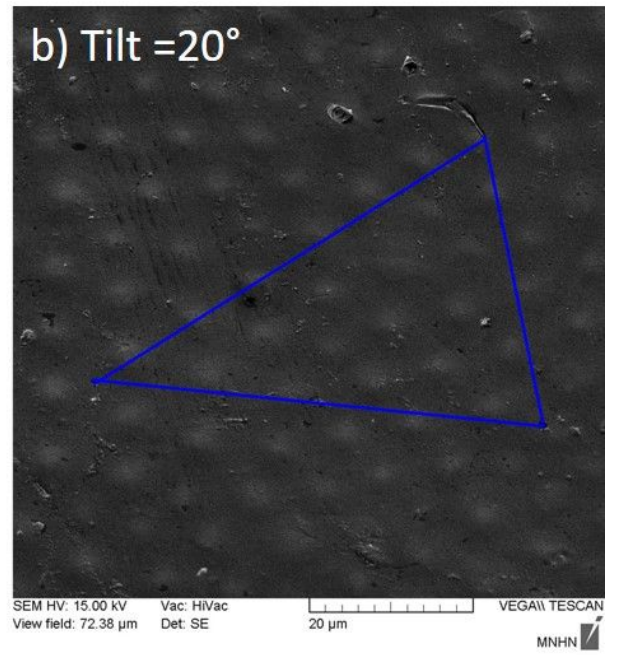
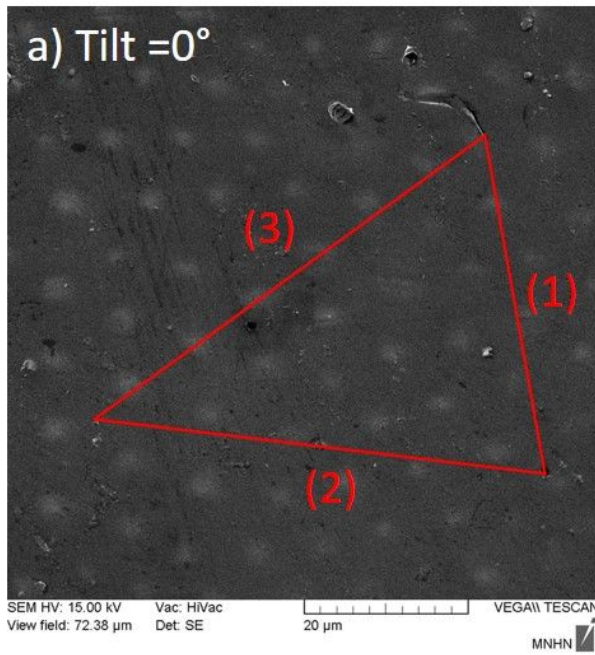


Figure 70 : Influence de l'angle d'inclinaison du faisceau d'électron (tilt) avec la normale à la surface de la ganoïne. a) Angle de tilt de 0° : les mesures des distances sont correctes mais le contraste de l'image faible. b) angle de tilt de 20° : les microtubercules sont mieux visibles (effet de perspective) mais l'image est distordue et les distances réduites selon l'axe de tilt. c) vue générale de l'écaille. d) superposition de la mesure des distances entre des objets identiques sur les vues a) et b)

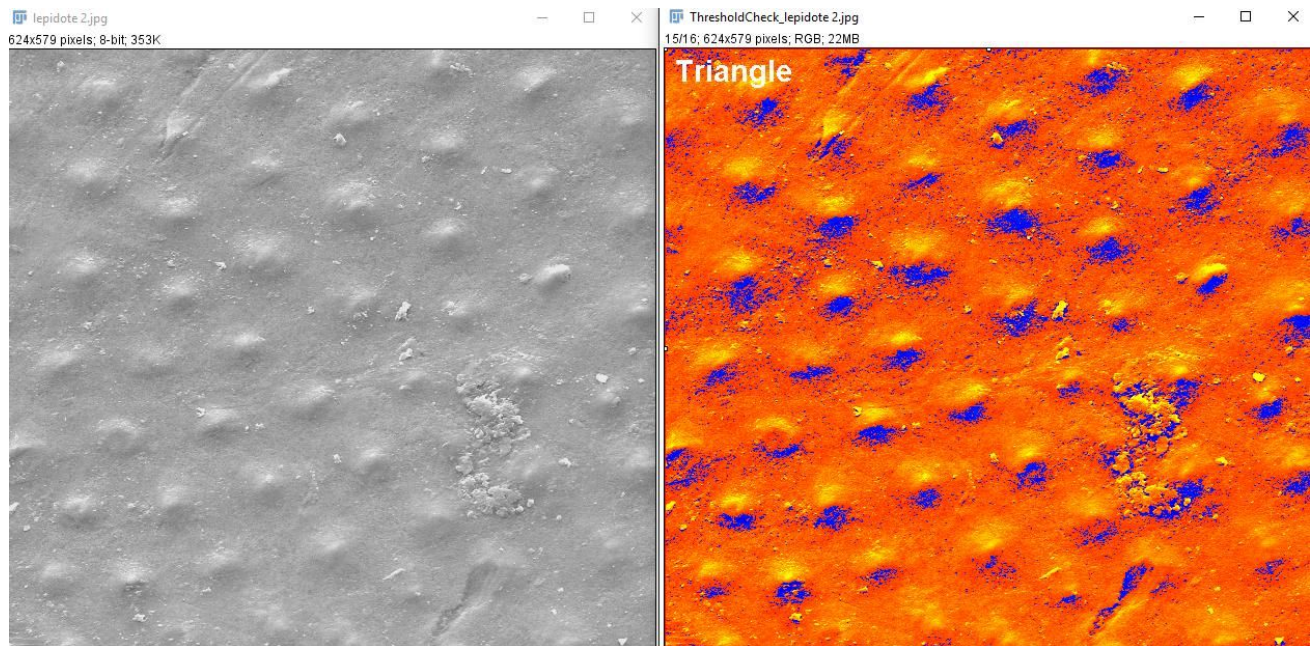


Figure 71 : Présence d'un ombrage sur les microtubercules de l'image MEB à gauche. L'image de droite montre la difficulté à seuiller correctement les contours des microtubercules suite à cet ombrage : seules les ombres (bleues) ou les parties brillantes (jaunes) de chaque microtubercule pourront être seuillées avec un niveau de gris donné.

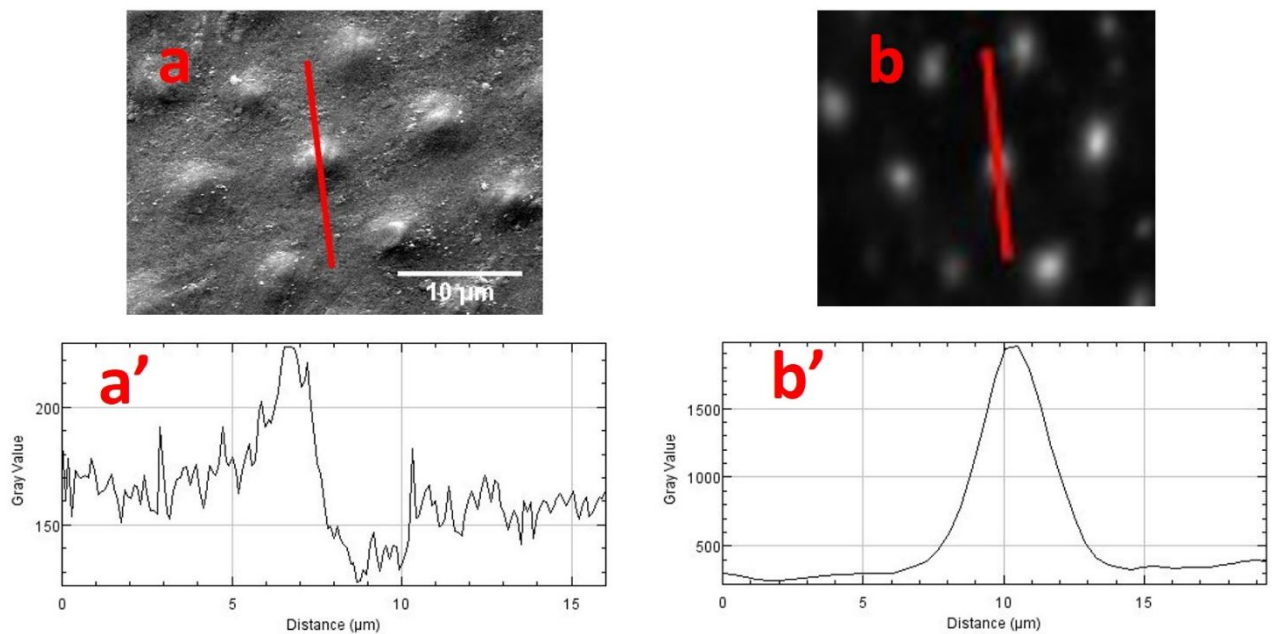


Figure 72 : Comparaison des profils de niveau de gris réalisés au travers de la section d'un microtubercule d'après une image de microscopie électronique à balayage et une image de microscopie optique ; (a) Image prise au MEB et (a') profil d'intensité associé selon le trait rouge ; (b) image prise en microscopie optique par contraste de phase sur un peel et (b') profil d'intensité associé selon le trait rouge.

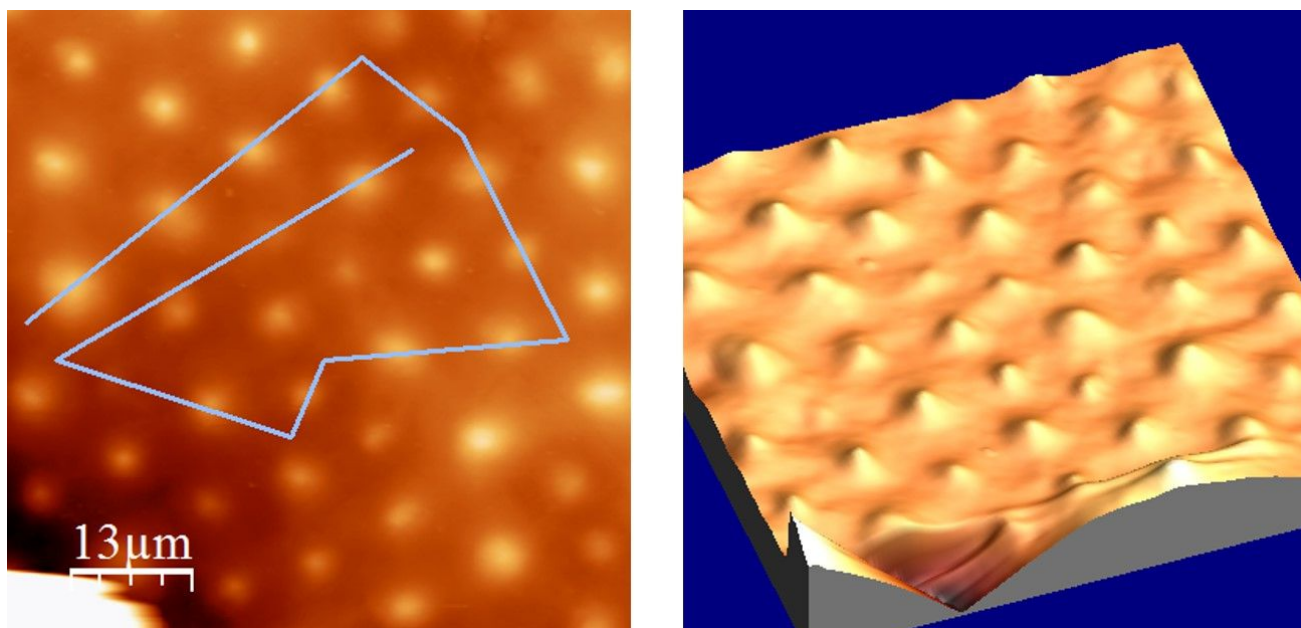


Figure 73 : observation en microscopie à force atomique de la surface de la ganoïne. Vue en code couleur à gauche et en perspective à droite de la hauteur relative des microtubercules.

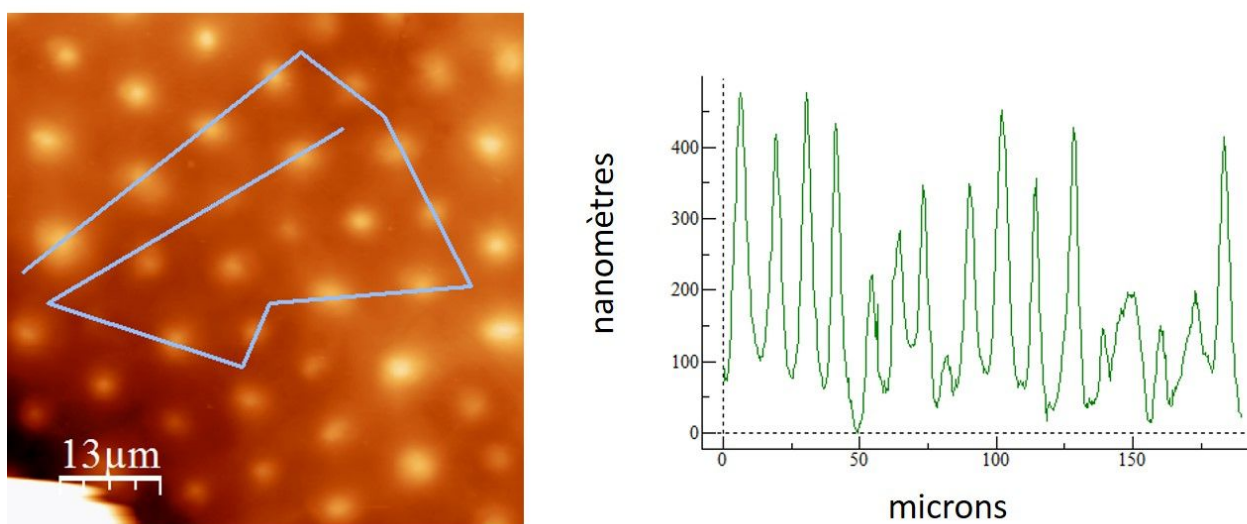


Figure 74 : observation en microscopie à force atomique. Vue en code couleur de la hauteur relative des microtubercules (image de gauche) et mesure quantitative des hauteurs des microtubercules situés le long du segment de droite brisée de couleur bleue.

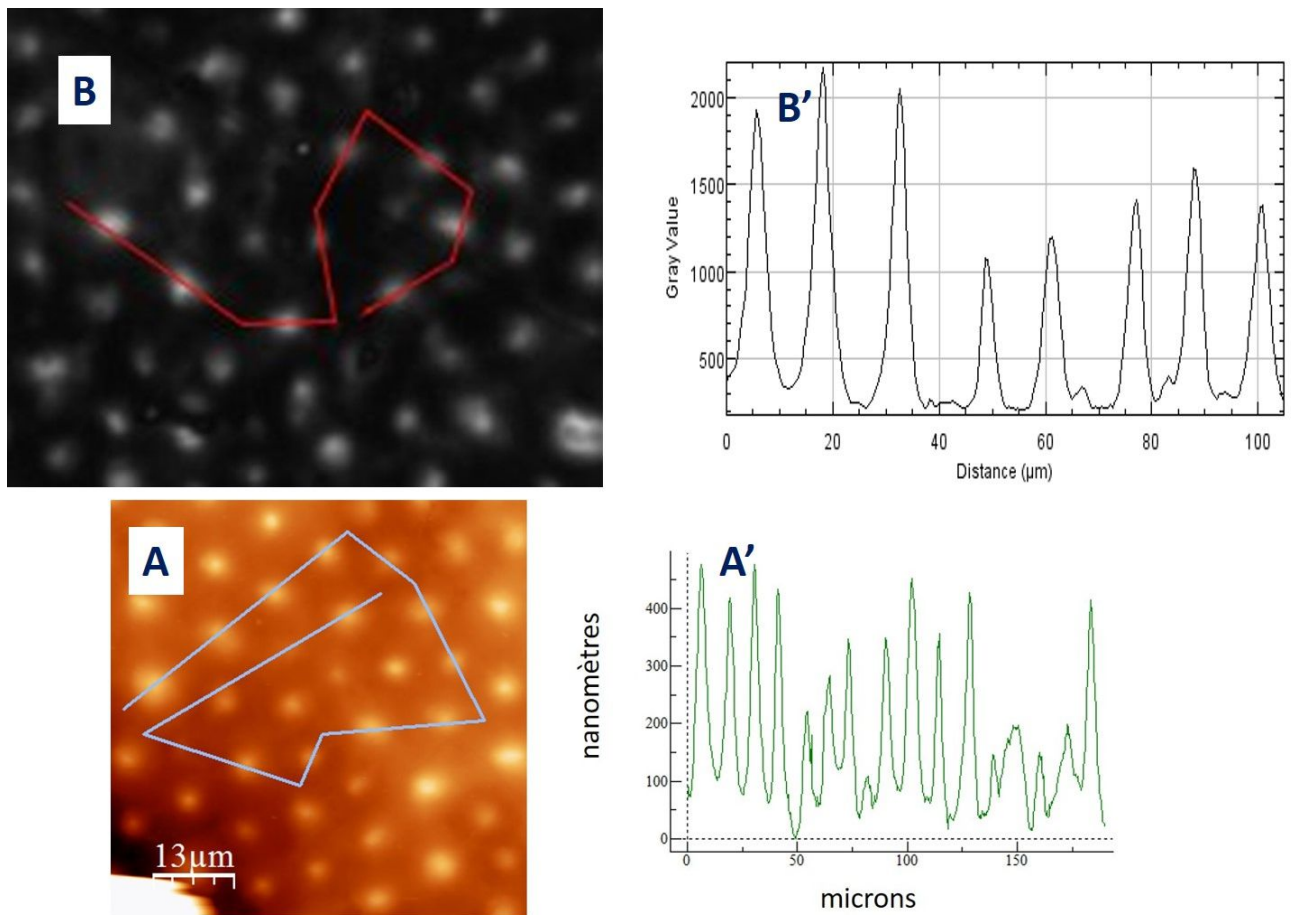


Figure 75 : Spécimen JRE.2008. Comparaison des variations de hauteur des microtubercules en AFM prise selon un contour (figures A et A') avec les variations relatives de niveaux de gris des microtubercules prises sur un contour différent provenant d'une image de microscopie en contraste de phase d'un peel (figures B et B').

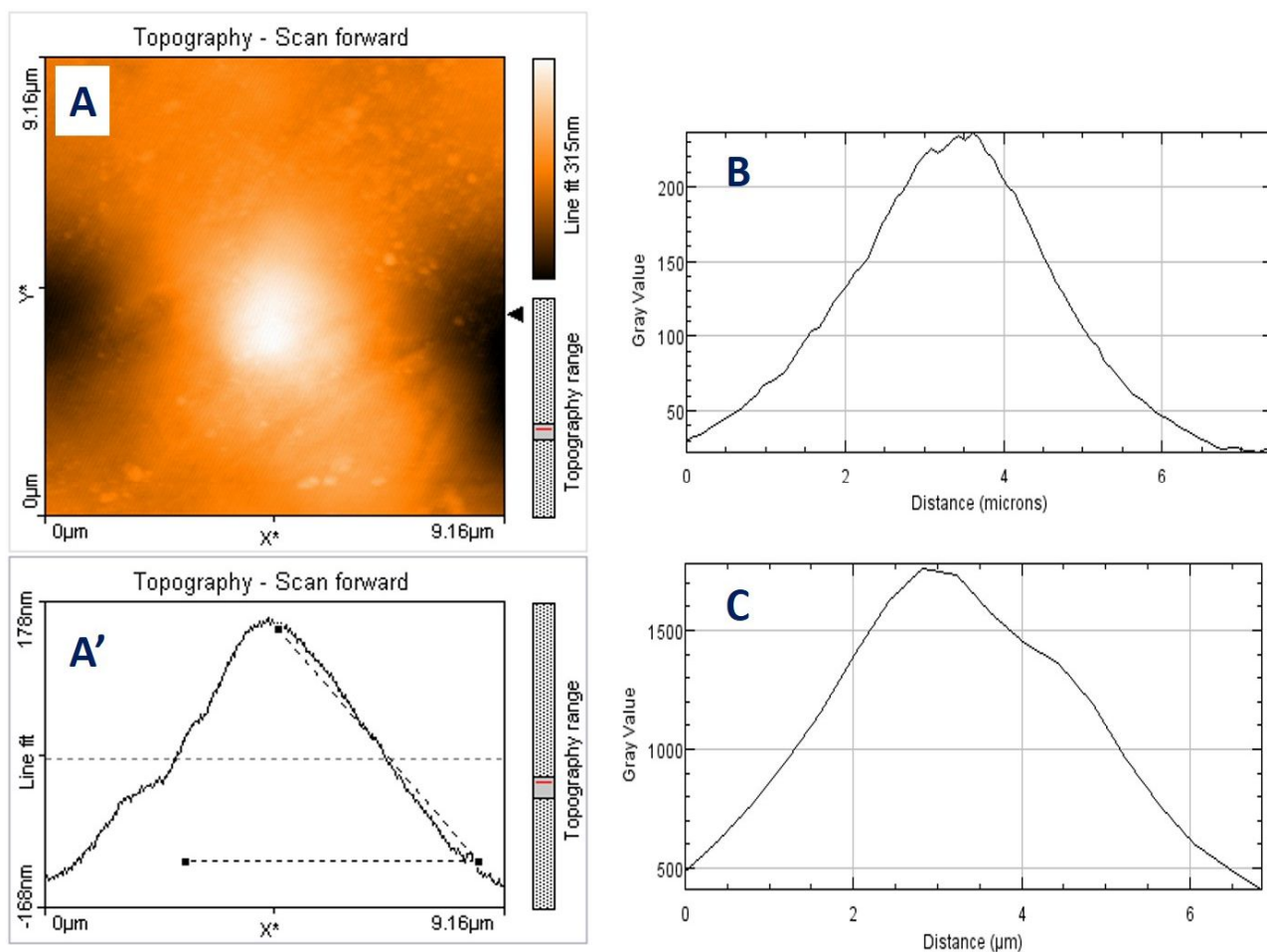


Figure 76 : Spécimen JRE.2008. Comparaison du profil de hauteur d'un microtubercule à partir d'une image AFM (figures A et A') avec deux profils de niveau de gris caractérisant deux microtubercules distincts. Les profils B et C proviennent de deux microscopes différents dont l'un est équipé d'une échelle dynamique d'acquisition plus grande et d'un système de phase avec une compensation du « halo » (profil C)

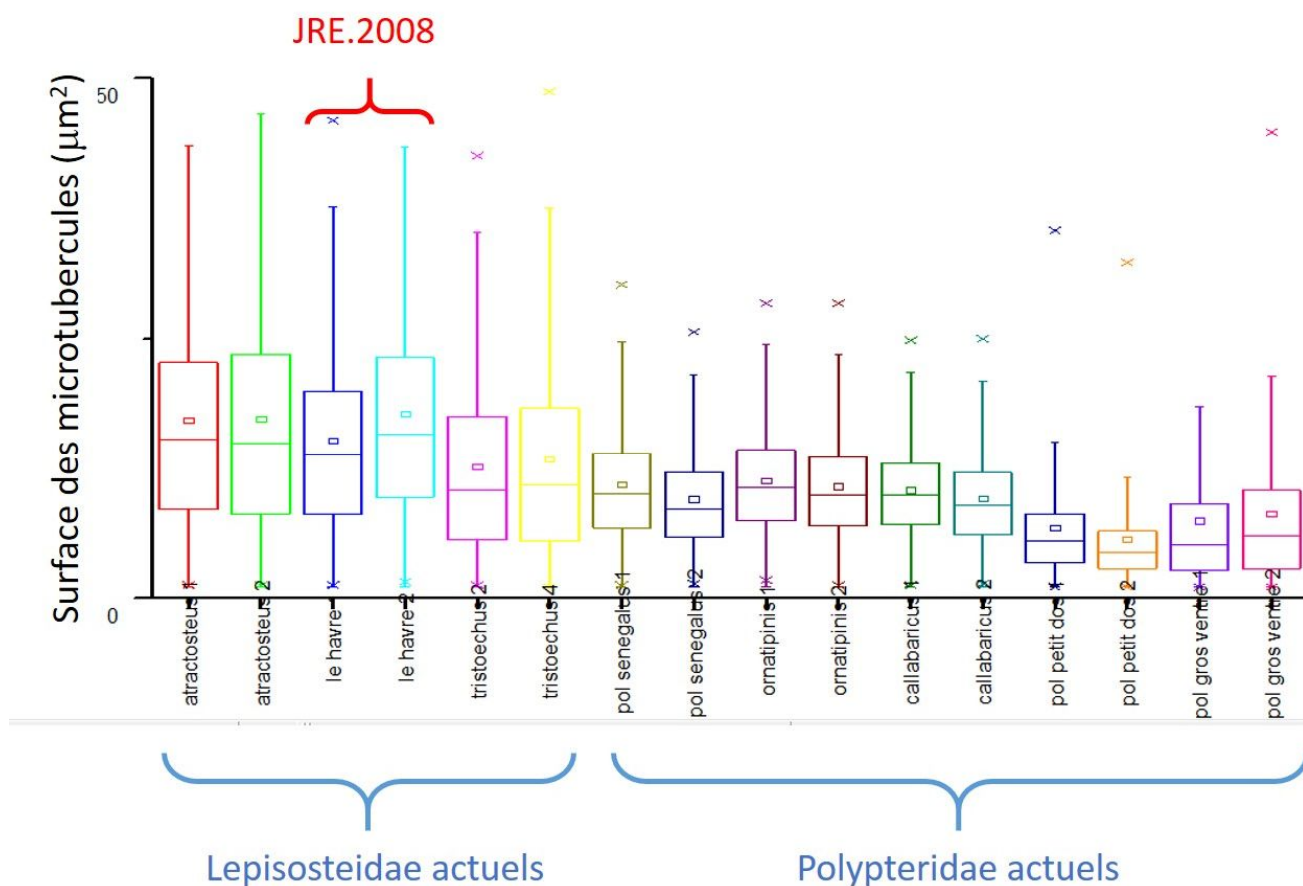


Figure 77 : Détermination des aires des microtubercules avec un seuillage global (« atractosteus » fait référence à l'espèce *Atractosteus spatula* et « tristoechus » à l'espèce *Atractosteus tristoechus*)

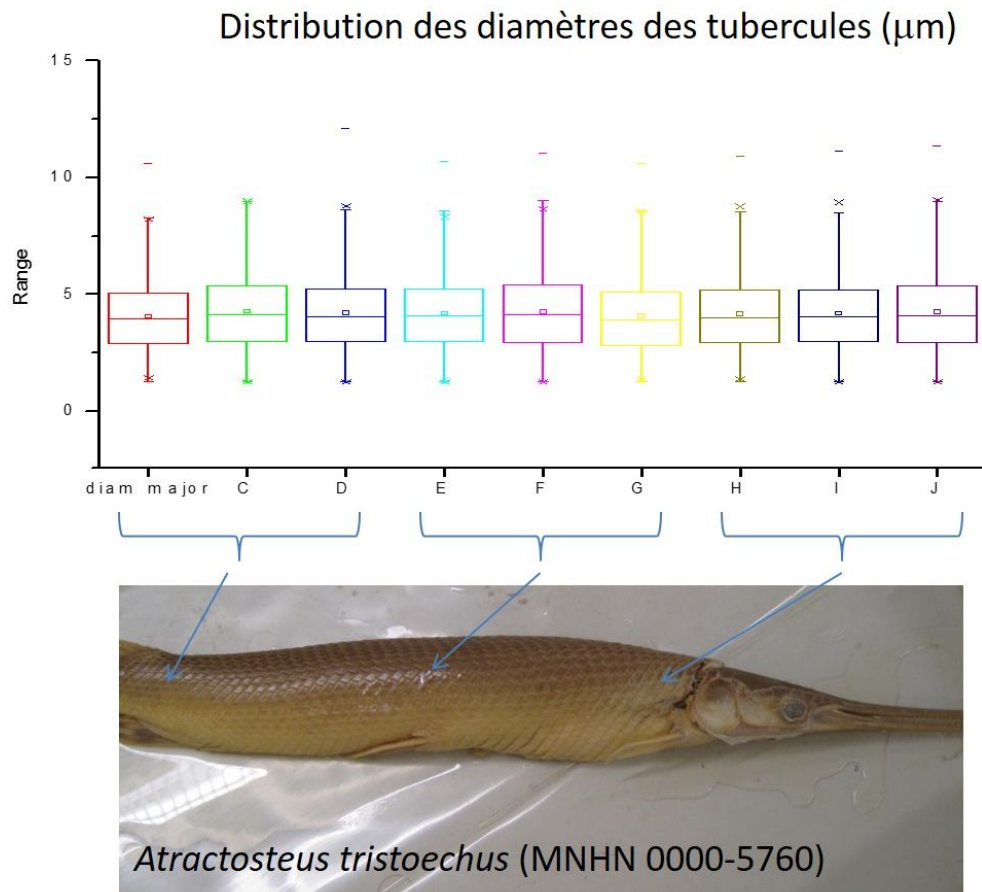


Figure 78 : Détermination des diamètres moyens des microtubercules en fonction de la position anatomique du peel sur le spécimen. Il s'agit ici du spécimen MNHN 0000-5760 récolté par Bocourt en 1871 au Guatemala.

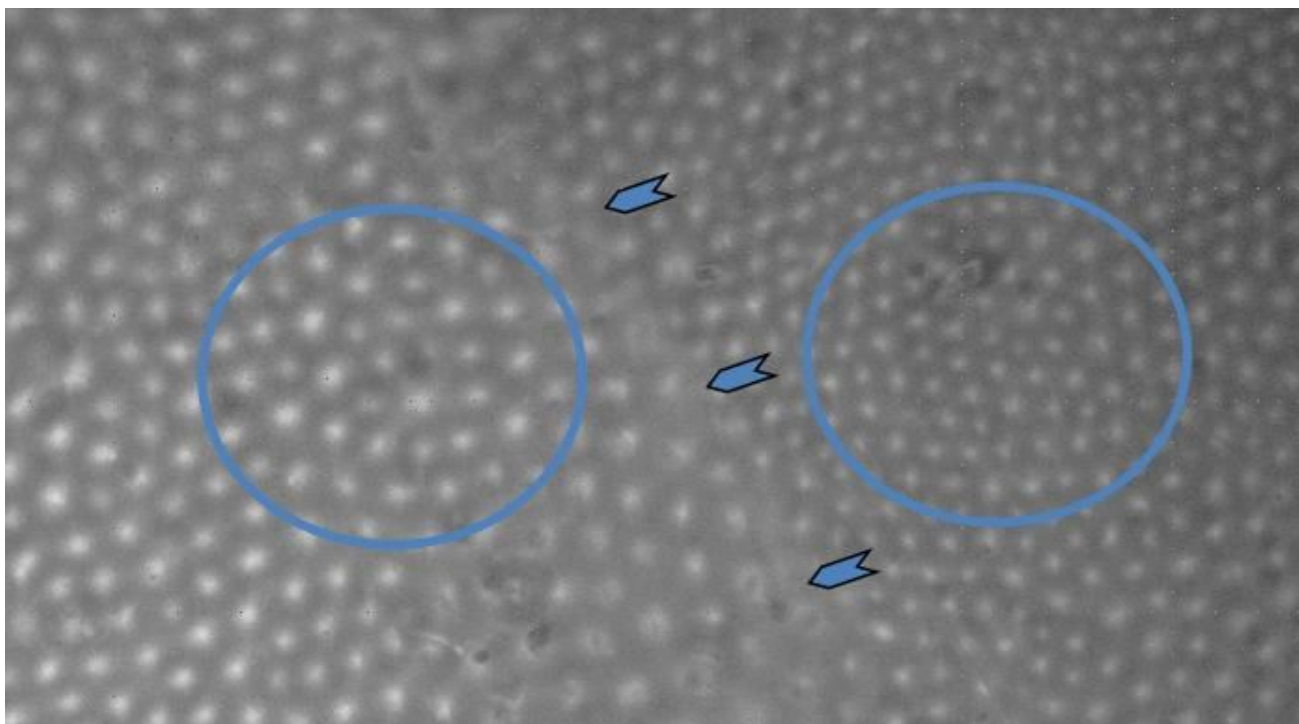


Figure 79 : *Lepidotes* JRE.2008. Premières observations qualitatives des microtubercules sur un microscope Nachet équipé en contraste de phase. Limite entre deux strates de ganoïne (flèches bleues). Les dimensions des microtubercules sont notablement différentes entre les deux strates (diamètres et distances). Sur la partie gauche de l'image la distance moyenne entre microtubercules voisins est de 12,8 microns ($n=100$, $SD=1,6$), elle est de 9,8 microns sur la partie droite ($n=100$, $SD=1,4$)

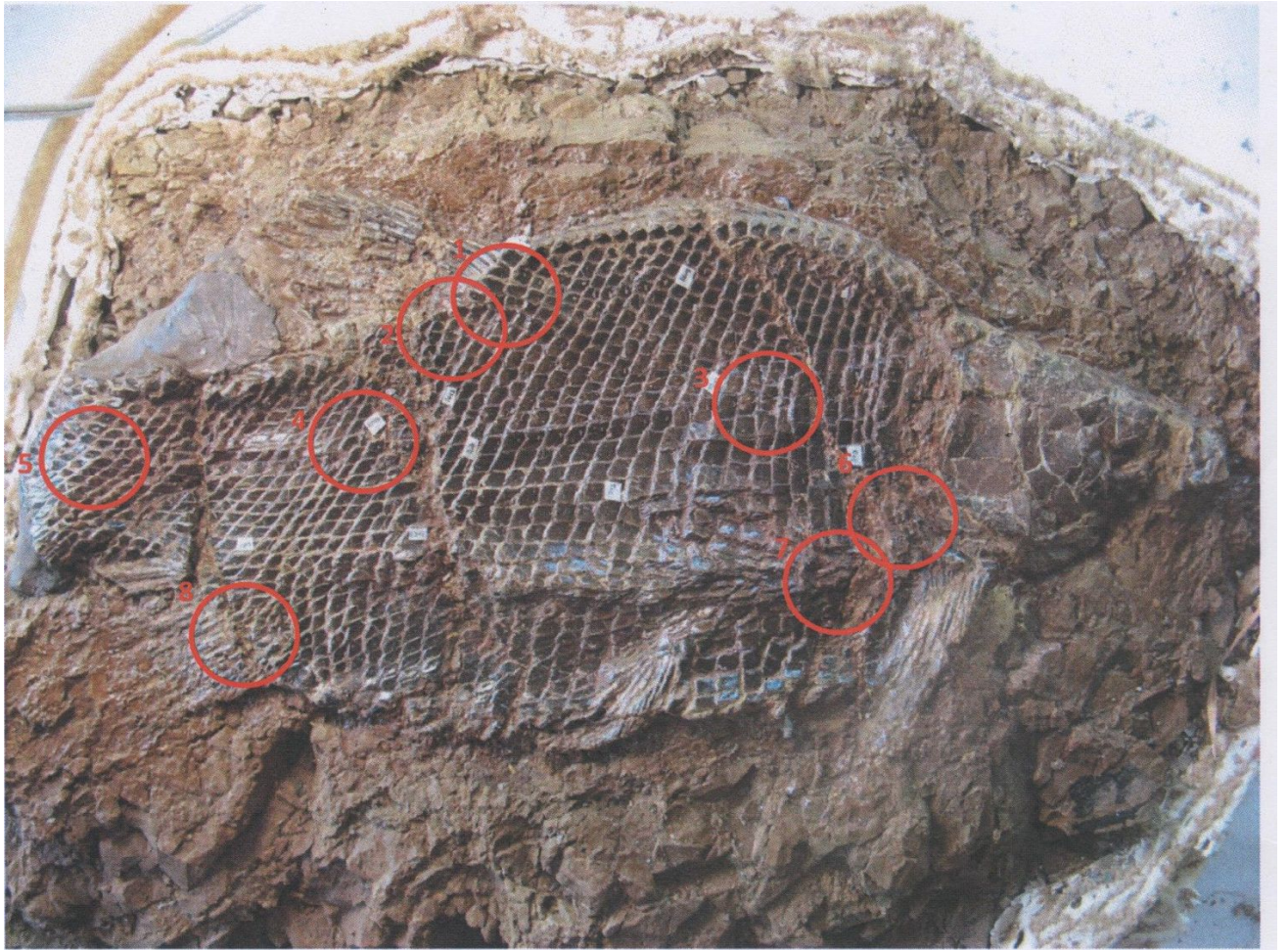


Figure 80 : Spécimen n°KS12-265 de †*Thaiichthys buddhabutrensis*. La position anatomique des peels référencés du n°1 au n°8 est indiquée par les cercles rouges (peels réalisés par U. Deesri).



Figure 81 : Comparaison des ornements de microtubercules (observations en D.I.C. au même grossissement) entre †*Thaiichthys buddhabutrensis*, *Polypterus senegalus*, *JRE.2008* et *Ban Sap Hin A1667*.

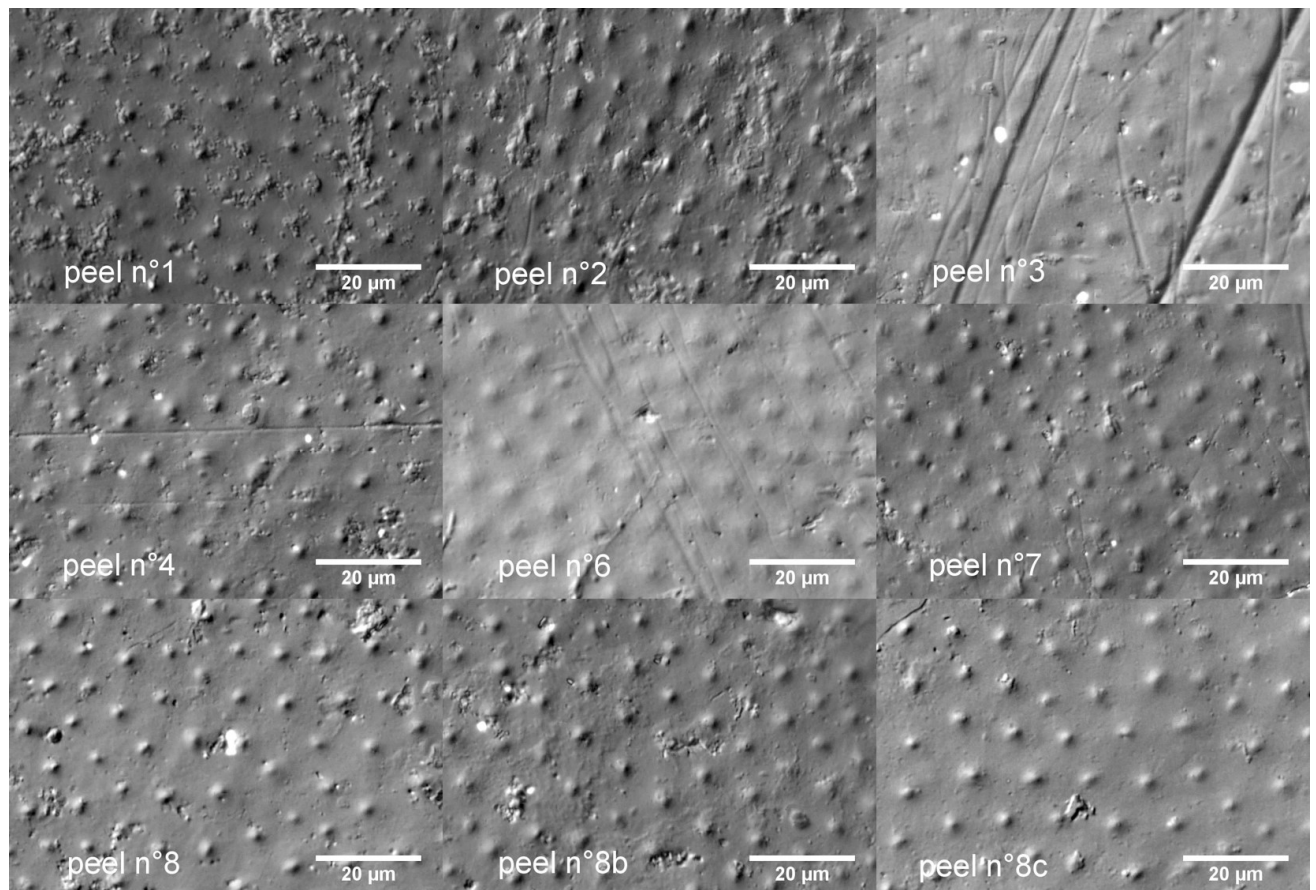


Figure 82 : Observations en D.I.C des différents peels de *†Thaiichthys buddhabutrensis*. Les peels références peel 8, 8b et 8c correspondent à différentes zones prises sur le peel n°8. On peut observer les différents défauts topographiques (poussières, rayures, etc..) qui interfèrent lors de l'étape de seuillage et doivent être filtrés.

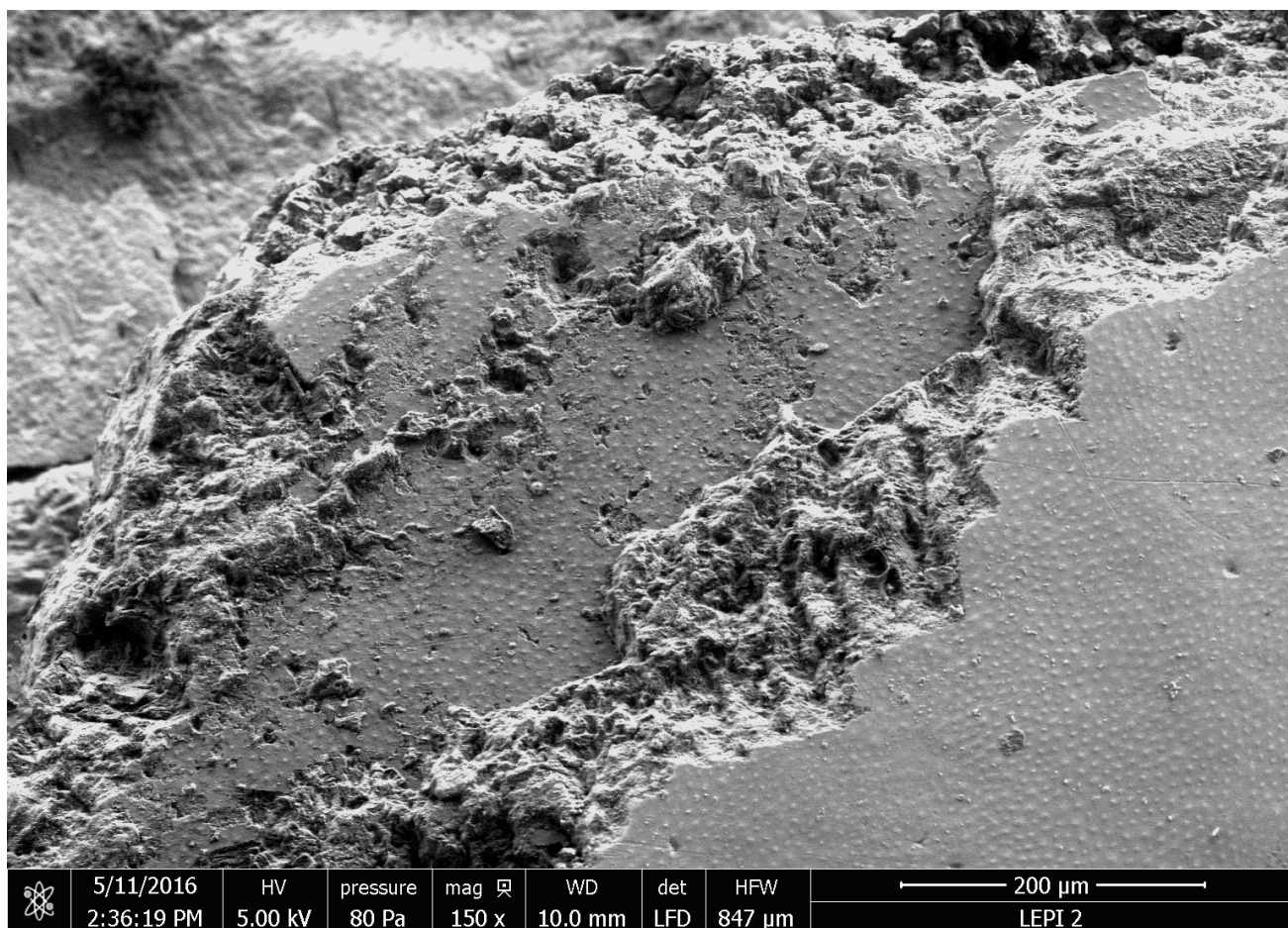


Figure 83 : *Lepidotes JRE.2008*. Ecaille brisée à son bord postérieur. Observation au MEB de l'ornementation des microtubercules à la surface de l'écaille (à droite), mais aussi sur une strate interne de ganoïne à l'issue de sa délamination (au centre.de l'image), près du bord brisé.

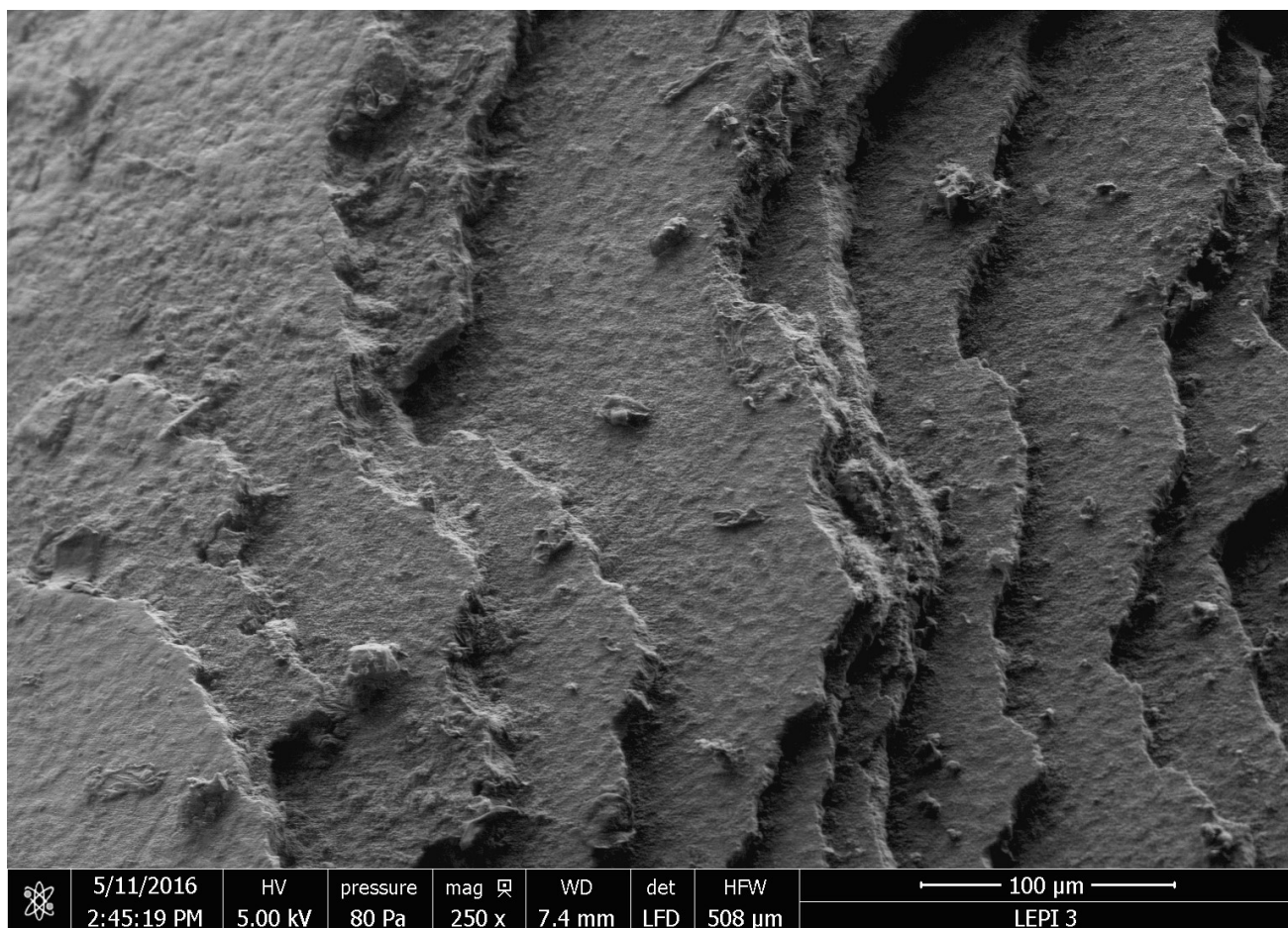


Figure 84 : Lepidotes JRE.2008. Zone de ganoïne localement dégradée (de couleur blanche et de nature friable). Phénomène de délamination entre chaque strate. Le relief des microtubercules est encore visible au niveau des différentes strates, bien que la ganoïne soit ici très dégradée.

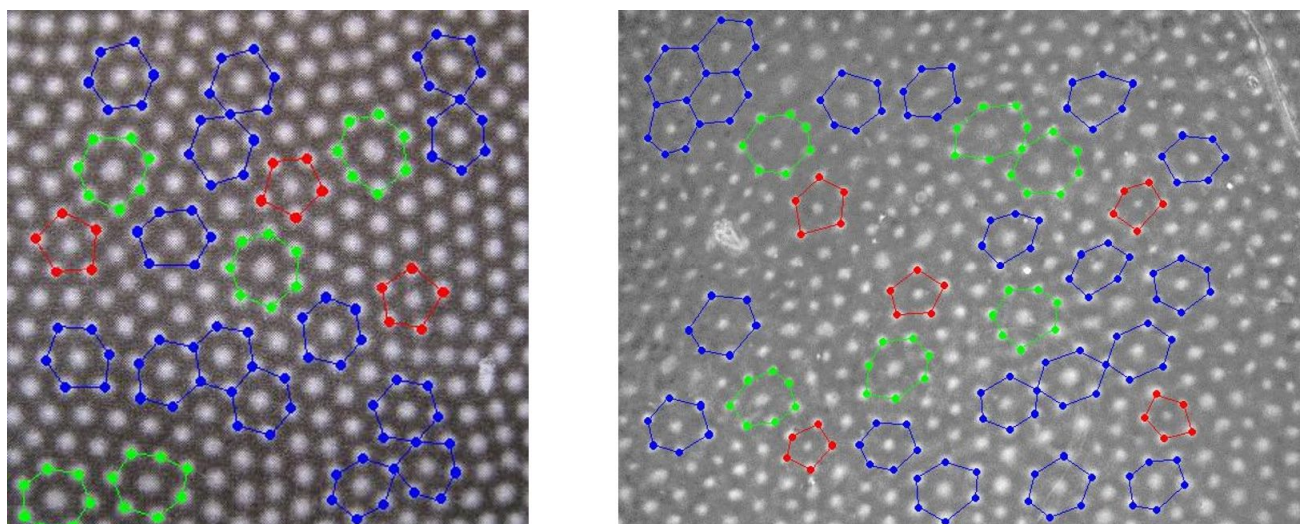


Figure 85 : Comparaison du phénomène d'auto-organisation généré par une réaction chimique du nom de CIMA (image de gauche extraite du livre « Shapes »(Ball , 2009)) et de l'ornementation des microtubercules observés en microscopie optique par contraste de phase sur le spécimen JRE.2008 (image de droite). Les motifs hexagonaux (bleus) sont très majoritaires par rapport aux motifs pentagonaux (rouge) et heptagonaux (verts).

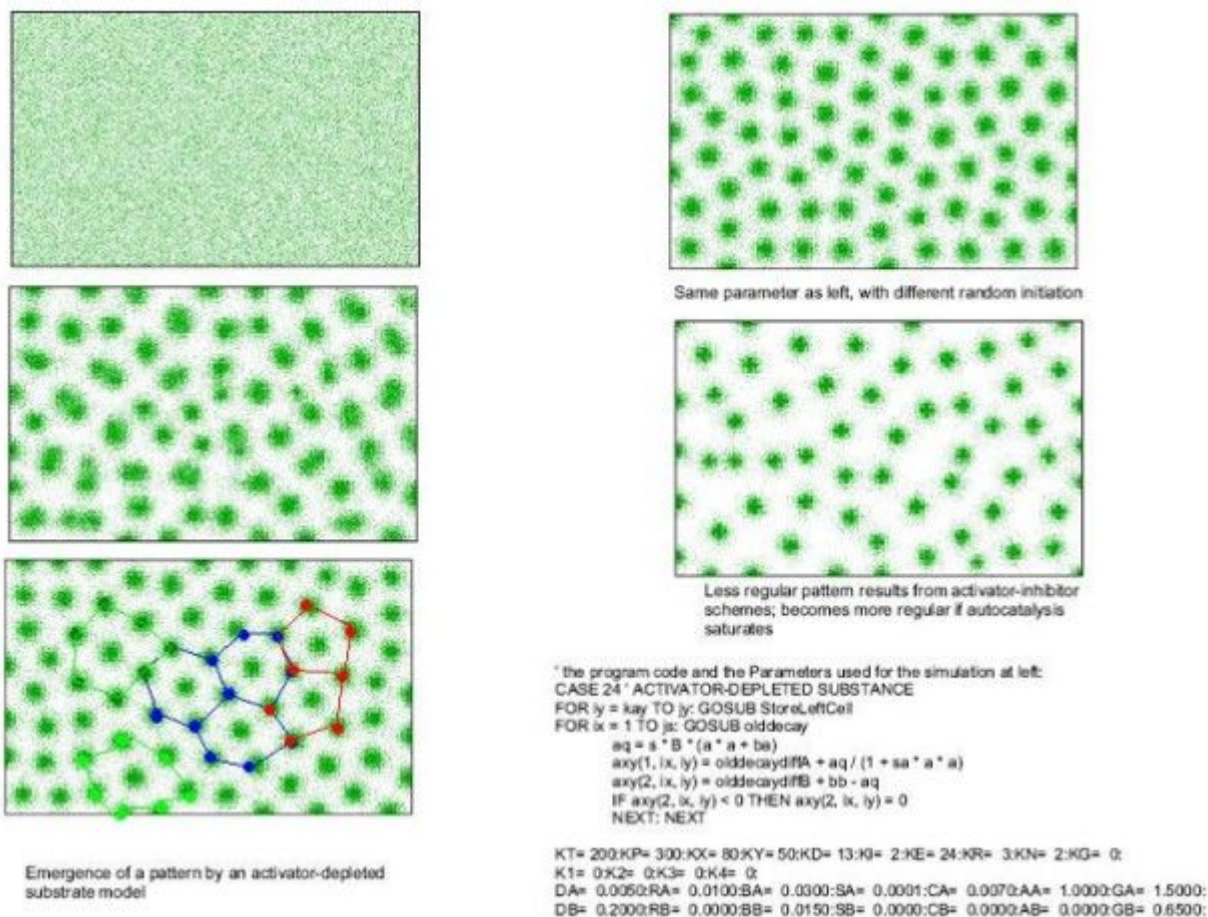


Figure 86 : Simulations réalisées par H. Meinhardt en 2010 du motif de points observé sur les images de microscopie optique par contraste de phase des peels selon un modèle théorique d'activation-inhibition ou bien un modèle d'activation et de déplétion du substrat (communication personnelle).

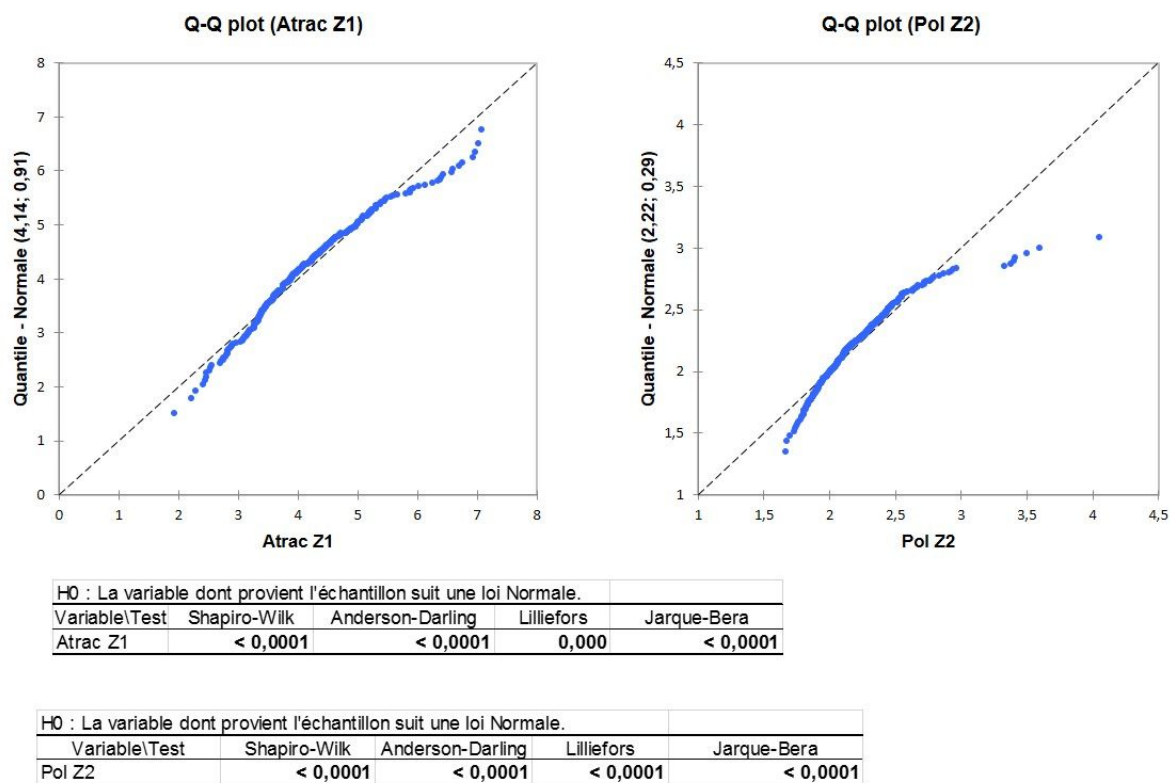


Figure 87 : Test de normalité et diagrammes Q-Q plot : les mesures des grands diamètres des populations de microtubercules d'Atractosteus spatula (Atrac Z₁) ou de Polypterus senegalus (Pol Z₂) selon les différentes zones observées (Z₁, Z₂, etc.) ne suivent pas une loi normale.

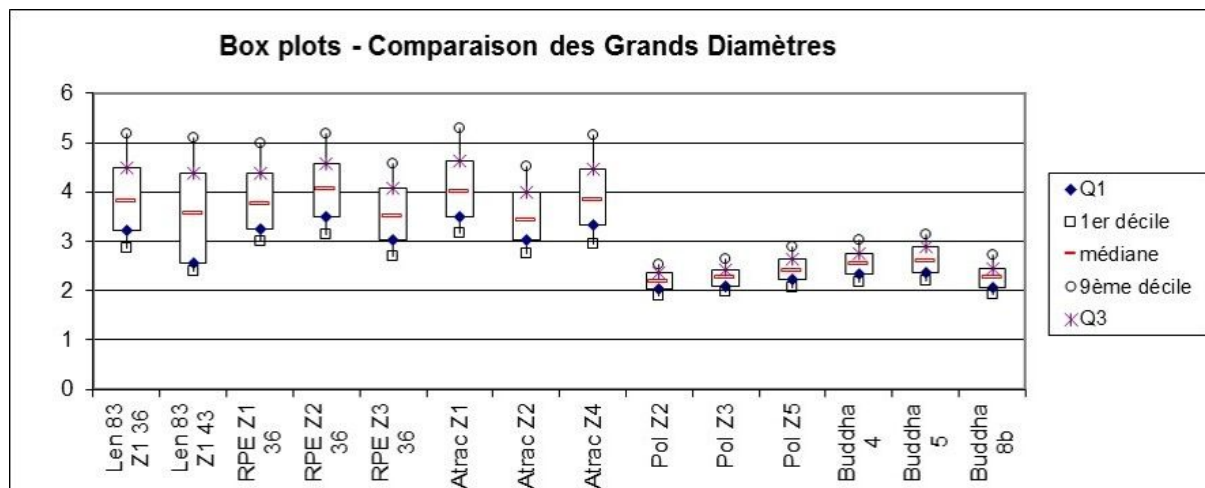


Figure 88 : Box plots associés aux mesures des grands diamètres des microtubercules pour différentes régions (Z₁, Z₂,...) des espèces suivantes : L. lennieri (Len 83 Zi), sémionotiforme indéterminé JRE.2008 (RPE Zi), Atractosteus spatula (Atrac Zi), Polypterus senegalus (Pol Zi) et †Thaiichthys buddhabutrensis (Buddha i).

TABLEAUX

	Longueur (mm)	Largeur (mm)	Epaisseur (mm)
Extrascapulaire droit	50	30	9
Extrascapulaire gauche	56	32	9
Dermoptérotique droit	55	27	8
Dermoptérotique gauche	55	26	9
Pariétal droit	53	33	9
Frontal droit	?	47	8
Opercule droit	127	60 (35 au bord sup.)	5
Opercule gauche	127	60 (34 au bord sup.)	5
Prémaxillaire droit	101	28	

Tableau 1 : Dimensions en mm des principaux ossements.

Nomenclature	Définition associée
can.W	ascending vascular canal of Williamson reaching the dentine layer
can.W'	vascular canal of Williamson not reaching the dentine layer
can. W''	non-vascular canal of Williamson not reaching the dentine layer
can _h	arch-like canal connecting the ascending canals of Williamson immediately underneath the dentine layer ie. neck-canal of Williamson
can. W' _d	canal of Williamson, probably non vascular, descending into the basal bone tissue from the superficial face of the scales
can. W _d	vascular canal of Williamson, descending into the scales from the sides of the ornamental ridges and reaching the dentine zones of growth in the basal part of these ridges
can.W _b	basal canal of Williamson

can.W _n	neck canal of Williamson
can.W _o	non-vascular canal of Williamson in a secondary osteon radiating from the axial vascular canal

Tableau 2 : Définitions d'Ørvig correspondant aux différents canaux de Williamson

Hypothèses sur la nature des <i>canaliculi</i> de Williamson de type II et la présence de dentine				
Auteurs	<i>Canaliculus</i> de Williamson (Non vasculaire)	Tubule de dentine	Canal Vasculaire (Selon Ørvig)	Présence de dentine
Williamson, 1949	OUI	NON	NON	OUI
Goodrich, 1907	OUI	NON	NON	NON
Ørvig, 1951	NON	NON	OUI	OUI
Schultze, 1966	NON (?)	NON	OUI (?)	OUI
Thomson & McCune, 1984b	NON	OUI	NON	OUI

Tableau 3 : Hypothèses sur la nature des canaliculi vasculaires de Williamson selon différents auteurs.

Tilt (°)	Segment 1	Segment 2	Segment 3
0°	41,5 µm	55,4 µm	58,3 µm
5°	39,9 (-4%)	55,1 (-0,5%)	57,9 (-0,7%)
10°	38,6 (-7%)	55,1 (-0,5%)	57,4 (-1,5%)
15°	37,2 (-11%)	55,0 (-0,7%)	56,8 (-2,6%)
20°	35,7 (-14%)	55,2 (-0,4%)	56,3 (-3,4%)

Tableau 4 : Variation des dimensions selon l'angle de Tilt pour les trois segments du triangle de la Figure 70.

Polypterus senegalus MNHN 2004-0185

	ZEISS					CEMIM	CEMIM circ>0,85 pas filtre V.	CEMIM circ>0,85
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Zone 4	Zone 5			
Nbr. mesures	384	467	411	464	379	783	779	774
Aire (μm^2)								
Moyenne	4,0	3,4	3,4	3,6	3,8	4,0	4,3	4,5
Écart-type	1,1	0,7	0,7	0,8	0,9	1,0	1,0	1,0
Diamètre grand axe (μm)								
Moyenne	2,4	2,2	2,3	2,3	2,4	2,4	2,5	2,6
Écart-type	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3
Diamètre petit axe (μm)								
Moyenne	2,0	1,9	1,9	2,0	2,0	2,1	2,2	2,2
Écart-type	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Distance entre voisins (μm)								
Moyenne	8,6	8,0	8,2	7,9	8,7		7,4	7,5
Écart-type	1,0	0,7	0,8	0,9	0,9		1,4	1,3

Tableau 5 : *Polypterus senegalus* MNHN 2004-0184. Mesure des aires, des diamètres des microtubercules, et des distances entre voisins, selon le protocole de mesure finalisé. Cinq zones différentes d'un même peel ont été observées et mesurées selon les mêmes conditions sur un microscope Zeiss (Zone 1 à 5). Le microscope (CEMIM) possède un dispositif de correction du halo lumineux observé en mode contraste de phase. Les trois dernières mesures montrent l'influence du protocole de traitement : elles proviennent du traitement d'une même image.

<i>Atractosteus Spatula</i> ref. E6-Tu 383 (L23)						
	ZEISS					CEMIM
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Zone 4	Zone 5	
Nbr. mesures	345	479	565	378	461	509
Aire (μm^2)						
Moyenne	10,2	7,8	7,0	9,7	11,0	13,6
Écart-type	3,9	2,9	2,7	3,9	4,0	4,2
Diamètre grand axe (μm)						
Moyenne	4,1	3,6	3,3	4,0	4,2	4,5
Écart-type	0,9	0,7	0,7	1,0	0,9	0,7
Diamètre petit axe (μm)						
Moyenne	3,1	2,7	2,6	3,0	3,2	3,7
Écart-type	0,6	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6
Distance entre voisins (μm)						
Moyenne	8,4	7,7	7,2	8,5	7,8	7,7
Écart-type	1,6	0,9	0,8	1,1	1,0	1,1

Tableau 6 : *Atractosteus spatula*. Mesure des dimensions des microtubercules selon le protocole finalisé. Toutes les mesures ont été faites sur le même peel, à différents endroits (zones 1 à 5). Deux microscopes avec (CEMIM) et sans (Zeiss) correction du « halo » provenant du contraste de phase ont été utilisés.

	JRE.2008 - ZEISS				Macrosemimimus Lenieri MHNH 7267 - ZEISS				
	Z 1 (36ms)	Z1 (43ms)	Z2 (36ms)	Z3 (36ms)	IM 8283 Z1 (36ms)	IM 8283 Z1 (43ms)	IM 8284 Z1 (33ms)	IM 8284 Z1 (42ms)	IM 8284 Z2 38
Nbre mesures	358	360	352	436	317	317	182	195	202
Aire (μm^2)									
Moyenne	9,3	9,7	8,4	7,1	9,7	10,0	9,0	9,2	9,0
écart-type	3,4	4,1	3,0	2,4	4,2	4,2	4,2	4,5	3,4
Diamètre grand axe (μm)									
Moyenne	3,9	4,0	3,9	3,4	4,1	4,2	3,9	4,0	3,9
écart-type	0,8	1,0	0,8	0,7	1,0	1,0	1,0	1,2	0,8
Diamètre petit axe (μm)									
Moyenne	2,9	3,0	2,7	2,6	2,9	3,0	2,8	2,8	2,8
écart type	0,5	0,5	0,5	0,4	0,7	0,7	0,6	0,6	0,6
Distance entre voisins (μm)									
Moyenne	8,6	8,6	8,7	7,7	9,0	9,3	10,1	10,2	10,1
écart type	1,2	1,2	1,1	1,3	1,8	1,6	2,2	1,8	2,1

Tableau 7 : Mesures de l'ornementation des microtubercules chez JRE.2008 et MHNH 7267 réalisées sur le microscope Zeiss. Les références Z1, Z2, Z3 correspondent à différentes zones d'observation sur un même peel ; les chiffres entre parenthèse indiquent le temps de l'exposition lors de l'acquisition des images. Im8283 et Im8284 font références à deux écailles différentes pour Macrosemimimus lenieri.

Test d'égalité des espérances: deux observations de variances égales								
	JRE2008	MHNH 7267				Tableau de données pour le test statistique :		Diamètre major Valeur moyenne
Moyenne	3,82	4,04					JRE2008	MHNH 7267
Variance	0,08	0,01				Observation n°1	3,9	4,1
Observations	4,00	5,00				Observation n°2	4,0	4,2
Variance pondérée	0,04					Observation n°3	3,9	3,9
Différence hypothétique des moyennes	0,00					Observation n°4	3,4	4,0
Degré de liberté	7,00					Observation n°5		3,9
Statistique t	-1,58					Moyenne (Valeur moyenne)	3,8	4,0
P(T<=t) unilatéral	0,08					Ecart-type (Valeur moyenne)	0,3	0,1
Valeur critique de t (unilatéral)	1,89					F-test : 0, 104 > 0,05		
P(T<=t) bilatéral	0,16							
Valeur critique de t (bilatéral)	2,36							

Tableau 8 : Test statistique réalisé sur les moyennes des moyennes des diamètres (grand axe) du Tableau 7.

<i>Lepidotes Buddhabutrensis</i> n°265					
	ZEISS				
	Peel n°2*	Peel n°4	Peel n°5	Peel n°7 *	Peel n°8
Nbre mesures	373	474	341	362	373
Aire (μm^2)					
Moyenne	3,8	4,2	4,5	4,9	3,3
écart-type	0,9	0,9	1,2	1,7	0,7
Diamètre grand axe (μm)					
Moyenne	2,5	2,6	2,6	2,3	2,4
écart-type	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3
Diamètre petit axe (μm)					
Moyenne	1,9	2,0	2,1	1,8	2,0
écart type	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2
Distance entre voisins (μm)					
Moyenne	7,6	7,3	8,3	8,0	8,3
écart type	1,8	1,0	1,8	1,5	1,1

Tableau 9 : Mesures de l'ornementation des microtubercules chez *Lepidotes buddhabutrensis* réalisées sur le microscope Zeiss. Cinq Peels réalisées à différents endroits ont été réalisés et analysés selon notre protocole finalisé. * Les Peels n°2 et 7 présentent des défauts topographiques et le nombre de mesures est réduit sur ces derniers.

				Test d'égalité des espérances: deux observations de variances égales		
					<i>Lep. Budha.</i>	<i>Pol. Sen.</i>
				Moyenne	2,48176063	2,32
				Variance	0,02017983	0,007
				Observations	5	5
				Variance pondérée	0,01358992	
				Différence hypothétique des mc	0	
				Degré de liberté	8	
				Statistique t	2,19398896	
				P(T<=t) unilatéral	0,02977473	
				Valeur critique de t (unilatéral)	1,85954804	
				P(T<=t) bilatéral	0,05954947	
				Valeur critique de t (bilatéral)	2,30600414	
				F-test	0,32964273	
				P-value =0,06> 0,05 Hyp nulle vérifiée .		

Tableau 10 : Comparaison des ornementations de *Thaichthys buddhabutrensis* et *Polypterus senegalus*. Test statistique bilatéral réalisé sur les moyennes des moyennes des grands diamètres (observations issues des Tableau 5 et Tableau 9)

ANNEXES

Macro-programmes réalisés :

Macro-programme pour déterminer les cellules de Voronoï associées à chaque microtubercule.

```
im=getImageID()
selectImage(im)
run("Median...", "radius=2");
run("Subtract Background...", "rolling=50");
run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");
run("8-bit");
run("Find Maxima...", "noise=32 output=[Single Points] ");
maxim=getImageID();
selectImage(maxim);
run("Voronoi");
setThreshold(0, 0);
run("Convert to Mask");
run("Set Measurements...", "area min center perimeter shape limit
redirect=image16bits decimal=3");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing display
exclude clear add");
```

Macro-programme pour seuiller individuellement chaque microtubercule.

```
run("Median...", "radius=2");
run("Subtract Background...", "rolling=50");
w= getWidth() ; h = getHeight();
for(i=0;i<roiManager("count");i++){
roiManager("Select",i);
getSelectionBounds(xmin, ymin, selwidth, selheight);
```

```

getRowStatistics(nPixels,mean, min,max);
seuil=((((max-min)/3)+min);
for(x=xmin;x<=(xmin+selwidth);x++){
for(y=ymin;y<=(ymin+selheight);y++){
    if (selectionContains(x,y)) {
        pix=getPixel(x,y);
        if(pix<seuil) setPixel(x,y,o);
        else setPixel (x,y,60000);
    } } }
setThreshold(o, 59999);
run("Convert to Mask");

```

Macro-programme pour définir les plus proches voisins et distances entre microtubercules.

```

print("\\Clear");
run("RGB Color");
setColor(255,0,0);
TabDistMin=newArray(nResults);
TabBest=newArray(nResults);
for(j=0;j<nResults;j++)
{
    xj=getResult("X",j);
    yj=getResult("Y",j);
    areaj=getResult("Area",j);
    distMin=getWidth()+getHeight();
    for(i=0;i<nResults;i++)
    {
        xi=getResult("X",i);
        yi=getResult("Y",i);
        dx=xi-xj;
        dy=yi-yj;
        distance = sqrt(dx*dx + dy*dy);
    }
}

```

```

        if((distance<distMin)&&(i!=j))
        {
            distMin=distance;
            bestPart=i;
        }
    TabDistMin[j] =distMin;
    TabBest[j]=bestPart;
    areabestPart=getResult("Area", bestPart);
    xbest=getResult("X",bestPart);
    ybest=getResult("Y",bestPart);
    circj = getResult( "Circ.", j );
    circbestPart = getResult( "Circ.", bestPart);
    if(circj>0.5 && circbestPart>0.5)
        print("j:",j+1,"bestpartj:",bestPart+1,"areaj:",areaj,"areabestPart:",areabestPart,"dis
tMinj:",distMin);
    //drawLine(xj,yj,xbest,ybest);
}
Array.getStatistics(TabDistMin,minDist,maxDist,meanDist,stdDevDist);
for(i=0;i<nResults;i++)
{
    circ = getResult( "Circ.", i );
    if(circ>0.5)
    {
        if(TabDistMin[i]<meanDist-stdDevDist/2)
            setColor(255,0,0);
    else {
        if(TabDistMin[i]<meanDist)
            setColor(255,128,0);
        else    {
            if(TabDistMin[i]<meanDist+stdDevDist/2)
                setColor(0,0,255);

```

```
        else
            setColor(0,128,255);
        }}
xi=getResult("X",i);
yi=getResult("Y",i);
best=TabBest[i];
xbest=getResult("X", best);
ybest=getResult("Y", best);
circbest = getResult( "Circ.", best );
if(circbest>0.5)
drawLine(xi,yi,xbest,ybest);
}}
```

Communication affichée :



V^e Rencontres de l'Ichtyologie en France
Paris, 27-30 mars 2012



Poster Session VII

Nouvelle méthode d'étude de l'ornementation des écailles ganoïdes
chez les poissons fossiles et actuels : implications systématique,
paléobiologique et évolutive

EUSTACHE René-Paul* (1)

(1) UMR CNRS 7207 (CR2P & EPHE), Muséum national d'histoire naturelle, Paris, France. [rene-paul.eustache@sfr.fr]

Lors de fouilles, si l'exhumation d'un poisson complet ou sub-complet reste un événement rare, la découverte d'écailles fossiles isolées est beaucoup plus commune. Certaines écailles rhomboïdes, épaisses, osseuses, recouvertes d'un email multistratifié, sont particulièrement bien conservées. Il s'agit des écailles ganoïdes (du Gr. *Ganos*, brillant). Actuellement présentes chez seulement deux groupes de poissons, les lépisostées et les polyptères, elles sont fréquentes dans le registre fossile. De nombreux auteurs ont essayé de rapporter les écailles ganoïdes isolées à une famille, à un genre, voire à une espèce de poisson fossile, sur des critères purement morphométriques. Beaucoup de ces attributions restent hasardeuses (Meunier *et al.*, RIF 2012). Ces écailles présentent à leur surface une ornementation microscopique constituée d'une multitude de petits tubercules aux formes arrondies. Cette ornementation, observée au microscope électronique à balayage (MEB), a été signalée par Schultze (Schultze, 1977) chez une espèce fossile, *Dapedium* sp. D'après Gayet et Meunier (1986), qui ont observé au MEB les variations de l'ornementation microscopique sur des écailles de plusieurs espèces actuelles et fossiles, la mesure des distances entre tubercules et la mesure des diamètres permettraient une attribution générique voire spécifique. La méthode qu'ils ont mise au point reste cependant peu employée. Peu de spécimens fossiles types issus des collections ont été étudiés pour éviter de les endommager de manière irréversible en prélevant une écaille sur des échantillons parfois fragiles. Enfin, le traitement statistique des données reste à ce jour incomplet. En conséquence, plusieurs questions sont encore à préciser : quels sont les liens entre l'ornementation microscopique des tubercules et la position de l'écaille sur le corps du poisson ? Quel est l'impact relatif des différences inter-individus (sexe, âge) et des différences inter-spécifiques sur les variations observées ? L'ornementation est-elle affectée par les processus biologiques et écologiques du poisson (cycles saisonniers, reproduction,

maladie, phénomènes migratoires) ? Enfin quel peut être l'impact de la fonction supposée de ces tubercules (contribution à l'accroche de l'épiderme sur l'écaille et/ou fonction hydrodynamique) sur leur distribution et leur forme ? Au vu de ces interrogations, la question reste encore ouverte de savoir si les variations observées sont bien exploitables en systématique dans le registre fossile. Notre objectif est de revisiter la méthodologie précédemment employée et de compléter les résultats obtenus. Nous proposons une nouvelle méthode d'étude de l'ornementation des tubercules, basée sur l'utilisation de répliques de surface ("peels") en acétate de cellulose puis leur examen en microscopie optique par contraste de phase. L'utilisation de "peels" permet de générer plus facilement une base de données conséquente de patrons de tubercules. Nous finalisons l'élaboration d'un protocole semi-automatique de traitement numérique des images pour pouvoir analyser rapidement un grand nombre de tubercules et disposer d'un échantillonnage représentatif, et poursuivons l'exploitation statistique de nos données. Les premiers résultats obtenus sur un échantillon de poissons actuels et fossiles issus des collections du MNHN, sont d'ores et déjà informatifs et prometteurs. Nous présentons des données sur les variations de l'ornementation du patron de tubercules ainsi que nos premières considérations vis-à-vis des questions posées.

Références

- Gayet M., Meunier F.J., 1986. Apport de l'étude de l'ornementation microscopique de la ganoïne dans la détermination de l'appartenance générique et/ou spécifique des écailles isolées. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 303, sér. II, n° 13, pp. 1259-1261.
- Meunier F.-J., Eustache R.-P., Dutheil D., 2012 (soumis). Réinterprétation paléohistologique des écailles du Crétacé supérieur saharien décrites par N. Tabaste. 1. Présence de Palaeonisciformes.
- Schultze H.P., 1977. Ausgansform und Entwicklung der rhombischen Schuppen der Osteichthyes (Pisces). *Paläont. Z.*, 51: 152-168.

Article de journal :

Histology of ganoid scales from the early Late Cretaceous of the Kem Kem beds, SE Morocco: systematic and evolutionary implications

by

François J. MEUNIER* (1), René-Paul EUSTACHE (2), Didier DUTHEIL (3) & Lionel CAVIN (4)



© SFI
Received: 24 Sep. 2015
Accepted: 19 Jan. 2016
Editor: J.-Y. Sire

Abstract. – In 1963, N. Tabaste described disconnected fossil material from the Saharan Cenomanian site of Gara Tabroumit, and especially three sets of isolated scales that she all referred to the genus *Lepidotes*. Although the rhomboid shape and overall morphology of one set of scales allow regarding them as ganoid scales, the external aspect of the ganoin is not as regularly smooth and shiny as it is in most lepidosteoid scales commonly referred to ginglymodian (“semionotiform”) fishes. A photonic microscopic study of scale ground sections definitively excludes the allocation of these scales to the genus *Lepidotes*, or to closely related genera, because of an interrupted ganoin layer, and, more generally to ginglymodians: *i*) the bony basal plate is deprived of Williamson’s canaliculi, which characterized holostean scales; *ii*) the basal plate is well vascularised and overlaid by a thick layer of dentine; *iii*) there is an elasmodine layer between dentine and the basal plate. These various histomorphological characters allow us to consider these ridged scales as belonging to a polypteriform fish, probably *Bawitius*. The histological specificities of the two other scale series allow their allocation to holostean taxa, respectively to “*Lepidotes*” *pankowskii* and to *Obaichthys africanus*. A new generic name, *Adrianaichthys*, is coined for “*Lepidotes*” *pankowskii*.

Résumé. – Histologie des écailles ganoïdes du site des Kem Kem, SE du Maroc (base du Crétacé supérieur) : implications systématiques et évolutives.

Key words

Polypteriformes
Ginglymodi
Bawitius
Lepidotes
Obaichthys
Adrianaichthys
Morocco
Cenomanian
Gonadoid scales
Paleohistology

En 1963, N. Tabaste a décrit, dans le site Cénomanien Saharien de Gara Tabroumit, du matériel fossile déconnecté, et tout particulièrement trois séries d’écailles isolées qu’elle a toutes attribuées au genre *Lepidotes*. Toutefois, nous avons été intrigués par l’aspect de la ganoïne à la surface de certaines écailles. Effectivement, si leur forme rhomboïde et leur épaisseur, associées à un faible recouvrement, permet de les ranger parmi les écailles ganoïdes elles n’ont pas une surface lisse régulière de ganoïne comme cela est décrit pour les écailles lépidostéoides des poissons ginglymodes (“semionotiformes”). L’étude microscopique de ces écailles, fondée sur des lames minces, permet de rejeter définitivement leur attribution au genre *Lepidotes*, et d’une façon plus générale leur appartenance à un ginglymode. Effectivement *i*) la plaque basale osseuse est dépourvue de canalicules de Williamson, structures qui caractérisent les holostéens ; *ii*) elle est abondamment vascularisée et recouverte d’une épaisse couche de dentine ; *iii*) une couche d’elasmodine est localisée entre la dentine et la plaque basale. Ces différentes caractéristiques histomorphologiques permettent de considérer ces écailles à ganoïne irrégulière comme appartenant à un Polypteriforme, probablement du genre *Bawitius*. En revanche, les caractéristiques histologiques des deux autres séries d’écailles sont compatibles avec celles des écailles des holostéens, respectivement “*Lepidotes*” *pankowskii* et *Obaichthys africanus*. Un nouveau nom de genre, *Adrianaichthys*, est donné à “*Lepidotes*” *pankowskii*.

Numerous fossiliferous beds yield unconnected elements, which are too incomplete to be referred to specific taxa on the basis of morphological characteristics only. Nevertheless, paleohistological techniques often allow taxonomical attributions at the order or family levels, at least. For example the first Mesozoic African polypterids were characterized owing to paleohistological studies of isolated scales (Gayet *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 2006), as well as the

first Mesozoic South American Polypteriformes (Gayet and Meunier, 1991, 1992; Meunier and Gayet, 1996, 1998; Dutra and Malabarba, 2001).

In Africa, several early Late Cretaceous formations are known for their rich fossil ichthyofaunas. The Mesozoic outcrops of the Kem Kem Beds in Morocco have yielded well preserved specimens (Dutheil, 1996, 1999a, b; Cavin and Brito, 2001; Filleul and Dutheil, 2001, 2004; Cavin

(1) UMR 7208 (CNRS-IRD-MNHN-UPMC), BOREA, Département des Milieux et Peuplements Aquatiques, Muséum national d’Histoire naturelle, C.P. 026, 43 rue Cuvier, 75231 Paris CEDEX 05, France.

(2) UMR 7207 (CNRS-MNHN-UPMC-EPHE CR2P), Muséum national d’Histoire naturelle, CP38, 57 rue Cuvier, 75231 Paris CEDEX 05, France [rene-paul.eustache@sfr.fr]

(3) 15 passage du Buisson Saint-Louis, 75010 Paris, France. [didierdutheil@paleopixel.com]

(4) Département de Géologie et Paléontologie, Muséum d’histoire naturelle de la Ville de Genève, CP6434, 1211 Genève 6, Suisse. [lionel.cavin@ville-ge.ch]

* Corresponding author [meunier@mnhn.fr]

and Forey, 2004, 2008; Forey and Cavin, 2007; Forey *et al.*, 2011), as well as the Bahariya locality in Egypt (Weiler, 1935; Stromer, 1936; Schaal, 1984; Grandstaff *et al.*, 2012) and localities in Niger and northern Sudan (Werner, 1993), among others. In addition, North African localities also delivered a fossil fish record composed of numerous isolated bones, in particular vertebrae, scales and teeth (Weiler, 1935; Stromer, 1936; Casier, 1961; Schaal, 1984; Werner, 1993; Le Loeuff *et al.*, 2010; Benyoucef *et al.*, 2015). The Kem Kem Beds (Morocco) have yielded numerous disconnected material such as teeth, scales and isolated fragments of skull (Khalloufi *et al.*, in press). N. Tabaste (1963) described from the Saharan Cenomanian site of Gara Tabroumit, disconnected fossil material, especially isolated scales. She referred three sets of scales to the genus *Lepidotes*, family Semionotidae, and a fourth set to *Stromerichthys*, the latter being now referred to *Obaichthys* (Grande, 2010).

The external morphology of ganoid scales show homoplastic characters, such as a rhombic shape, a regular ganoine surface, a peg and socket articulation (Schultze, 1977; Janvier, 1996; among others). These characters are shared by different clades, and consequently the taxonomic attribution of isolated ganoid scales can be erroneous when only based on morphological features. However, taxonomic assignment can be improved with morphological specific features, such as the microtubercles at the surface of the ganoine (Gayet and Meunier, 1986; Gayet *et al.*, 1988; Meunier and Gayet, 1996) and/or with accurate histological data (Schultze, 1966, 1968, 1977; Meunier and Brito, 2004). Among the three different scale morphologies referred to "*Lepidotes*" by Tabaste (1963), we were intrigued by one of them, in which the external morphology was incompatible with that of a ginglymodian taxon. Although the rhomboid shape of these scales, their thickness and the thin layer of ganoine allow to attribute them to the ganoid type, their surface is not regularly smooth and shiny as described in the lepidosteoid scales of ginglymodian fishes (Goodrich, 1907; Schultze, 1977; Sire *et al.*, 2009). These peculiar scales show few shiny ridges overlaying a matt surface. We had the opportunity to do a histomorphological study of the material analysed by Tabaste, together with some new isolated material coming from the Kem Kem beds in Morocco. Here, we provide the descriptions of these various isolated scales, which constitute a complement to the recent systematic revision to the bony fish assemblage from the Cenomanian of the Kem Kem beds in Morocco (Cavin *et al.*, 2015).

MATERIAL AND METHODS

Material studied

MNHN-HGN 93, MRS 45, MRS 52. – Material studied by N. Tabaste (1963) and collected by Lavocat from Gara

Tabroumit (see Tabaste, 1963). At least 3 to 4 scales from each type.

MNHN-Histos 1959-1989. – Material from the Cenomanian Kem Kem beds, collected by one of us (DD, private collection). Ground sections registered in the National Museum of Natural History of Paris.

Methods

Ground sections. – The scales were embedded in stratylin resin (Chronolite 2060). Transverse and longitudinal sections were performed with a sawing machine; the sections were ground and polished to obtain adequate thickness for a microscopical observation (50–80 μm). They were observed with a microscope "Axiovert" in transmitted natural light and polarized light.

Peel observations. – Replica of the scale surfaces (peels) were done with cellulose acetate films. Peels were examined by phase contrast microscopy and a quantitative study of the dimensions of the microtubercles (when present onto the ganoine surface) was done with "Image J" software (Eustache *et al.*, unpubl. data).

SEM observations. – Scale surfaces were coated with a gold layer (20 nm thick) and examined in secondary electron imaging mode, with the scanning electron microscope "TESCAN VEGAII LSU" operating at 15 kV.

SYSTEMATIC PALAEOONTOLOGY

Holostei Müller, 1844 (*sensu* Grande, 2010)
Ginglymodi Cope, 1872 (*sensu* Grande, 2010)
LEPISOSTEIFORMES Hay, 1929 (*sensu* López-Arbarello, 2012)

Adrianaichthys gen. nov.

Type species. – *Adrianaichthys pankowskii* (Forey, López-Arbarello & MacLeod, 2011)

Diagnosis. – As for the type and only known species, see Forey *et al.* (2011).

Etymology. – In honour of Adriana López-Arbarello, palaeoichthyologist at the Bayerische Staatssammlung für Paläontologie und Geologie, München, who undertook the difficult task to untangle the phylogeny and systematics of ginglymodian fish, and '*ichthys*' (fish in Greek).

Remarks. – In their original description of "*Lepidotes*" *pankowskii*, Forey *et al.* (2011) pointed out the heterogeneous status of the genus "*Lepidotes*", which was at that time in urgent need of revision. López-Arbarello (2012), in a revision of several ginglymodian taxa, did not include this species in her phylogenetic analysis, but suggested that "*L. pankowskii*" is most probably a lepisosteiform incertae generis.

In subsequent articles dealing with this species, the genus *Lepidotes* was generally quoted between inverted comma (Bermúdez-Rochas and Poyato-Ariza, 2015; Benyoucef *et al.*, 2015) or preceded by a question mark (Cavin *et al.*, 2015). In order to clarify this situation, a new genus name is coined. Among other characters, *Adrianaichthys* gen. nov. differs from *Lepidotes* as defined by López-Arbarello (2012) by its first anterior infraorbital bone not deeper than the more posterior anterior infraorbitals, three pairs of extrascapulars (versus one) and eight suborbitals, four of which lying in front of the orbit. According to López-Arbarello (2012), *Adrianaichthys pankowskii* shows characters of *Lepisosteiformes*, such as scales with rostro-caudal articulation through anterior dorsal and ventral processes, co-ossified vomers, three or more pairs of extrascapulars, closed circumorbital bone ring, and large supraorbital bone longest ventrally, contacting more than one infraorbital bone. We include here *A. pankowskii* in the *Lepisosteiformes*, pending a revision of the species.

RESULTS

Morphology

All studied scales have a rhomboidal shape; they are thick with a small cover of enamel (Fig. 1). The whole sample of scales can be divided in four types according to their ornamentation.

Type I. The first series regroups thick and large rhomboid scales with a regular ganoine layer on the surface; the latter looks altered probably because of erosion (Fig. 1A, B). Some scales with a sagittal symmetry had a medio-dorsal localisation on the back of the fish. Some other scales have two anterior processes, which protrude from the anteroventral and anterodorsal corners. These two anterior processes have been observed in the scales of many specimens assigned to "*Lepidotes*" and closely related genera (Cavin *et al.*, 2009;

López-Arbarello, 2012). Such scales with a regular ganoine cover are common in the Kem Kem beds and were referred to *Adrianaichthys pankowskii* (Cavin *et al.*, 2015). However, the worn surface of the ganoine layer of these scales prevented the observation of possible thin microreliefs.

Type II. The scales of this type have a shiny surface with antero-posterior ridges (Figs 1C-E), the median one being frequently more pronounced with a posterior sharp extremity (Fig. 1D). These scales, which were previously referred to *Stromerichthys* (Weiler, 1935; Casier, 1961; Tabaste, 1963; Jonet, 1971; Torices *et al.*, 2012; Vullo *et al.*, 2009), belong to *Obaichthys africanus* (Grande, 2010; Cavin *et al.*, 2015). SEM examinations of the ganoine ridges have revealed microtubercles (not illustrated). Peels studies indicate that these microtubercles are large and closely packed, as in *Lepisosteus* scales (Gayet and Meunier, 1986).

Types III and IV. Two series of scales share an irregular surface of ganoine (Fig. 1F-I). The first series is constituted by 10-20 mm-broad scales showing either irregular patches (Fig. 1F) or more or less parallel and ramified ridges (Fig. 1H) of ganoine. The second series regroups scales that are less than 10 mm in length and bear a ganoine cover made of parallel shiny ridges (Fig. 1G-I). In these two series, the scale surface looks matt between the ridges or the patches of ganoine (Fig. 1F-I). We refer these scales to "paleoniscid" fish, possibly a polypteriform such as *Bawitius*. We do not consider *Bawitius* as a Polypteridae because of the interrupted ganoine layer (see Discussion).

SEM examinations of the palaeoniscoid scale surface (Fig. 2A) have revealed various, minute ornamentations, but we have not observed microtubercles on the whole surface of ganoine (Fig. 2B, C). They have been either worn out by erosion or, more likely, originally missing, except in the rim of some ganoine patches (Fig. 2D) (see Discussion); here and there the ganoine of the ridged palaeoniscoid scales showed microreliefs, either microtubercles and/or thin elongated hollows (Fig. 2D, E). The scales with irregular ganoine

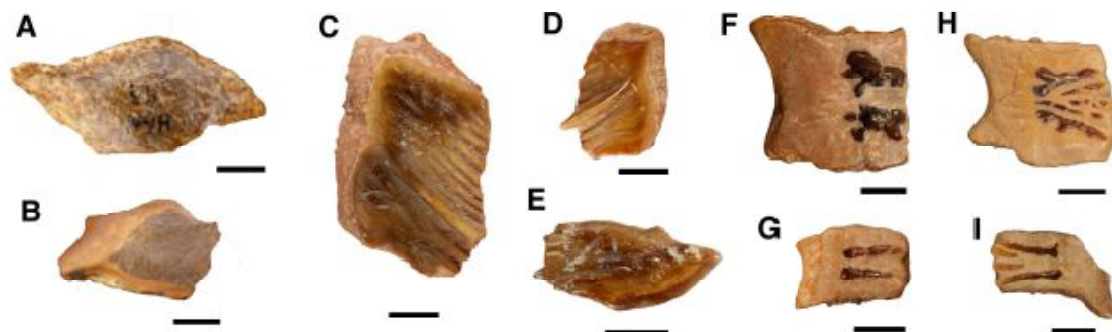


Figure 1. - Isolated scales of the Kem Kem beds. A, C-H. Scales studied by Tabaste (1963). A: *Adrianaichthys* sp. (fig. 9, Pl X); B: *Adrianaichthys* sp., scale sampled by one of us D.D.; C-E: *Obaichthys* sp. (figs 6, 7, 9, Pl XI); F, H: *Bawitius* sp. (figs 4, 5, Pl XI); G, I: Palaeonisciformes (figs 1, 2, Pl XI). Scale bars: A, B, F-I = 1 cm; C-E = 5 mm.

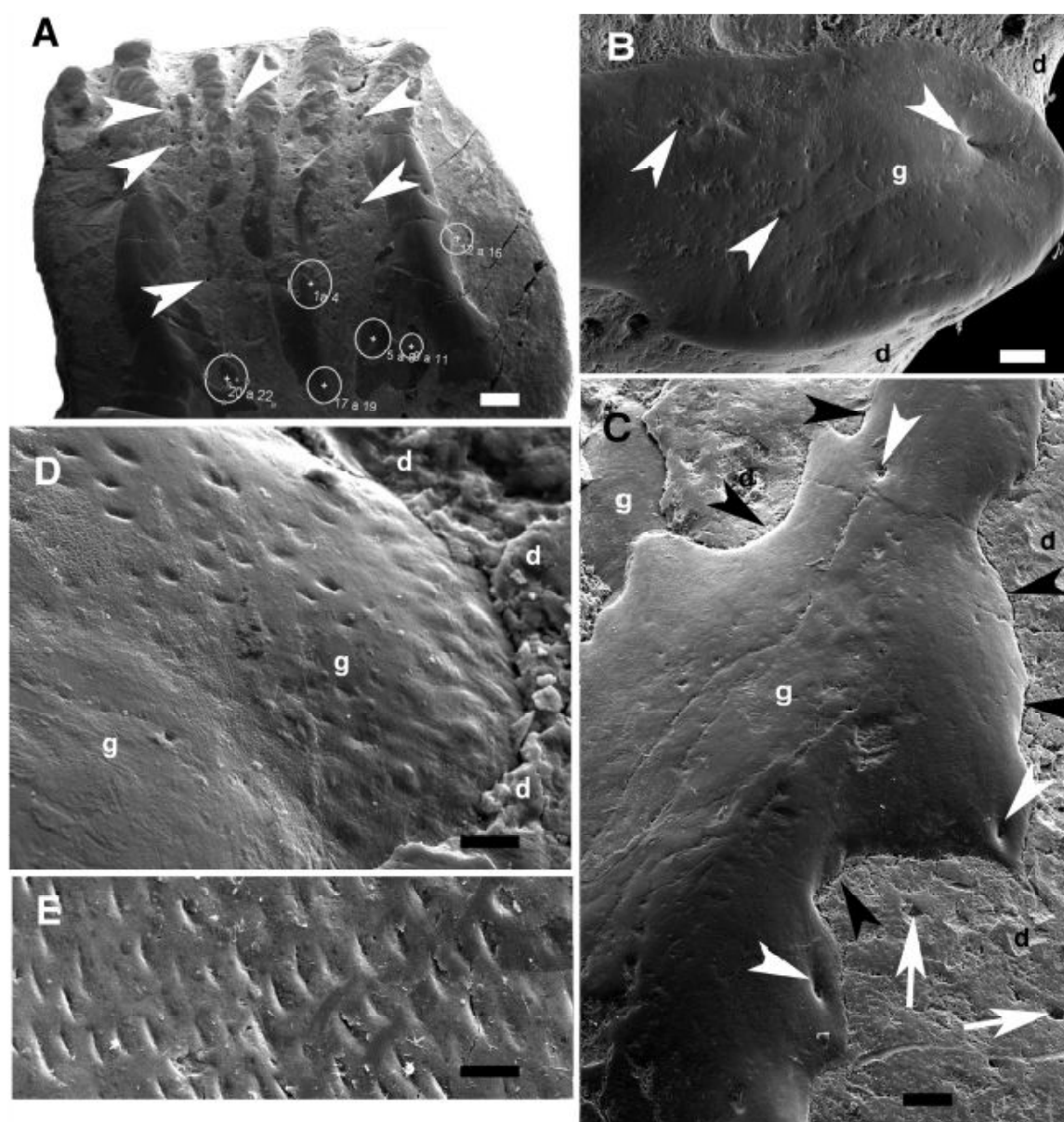


Figure 2. - Scales of *Bawittius* (SEM). Upper surface. **A**: A ridged scale. The circles and the arrowheads localize respectively the areas of the observation of ganoine microreliefs and vascular apertures; **B**: Detail of the posterior extremity of a ganoine ridge. The contact between the ganoine and the dentine looks regular. Vascular apertures on the ganoine surface are visible (arrowheads); **C**: Detail of a ganoine ridge showing its contact with dentine (black arrowheads). The white arrowheads and arrows point to holes indicating vascular canal apertures respectively at the surface of ganoine and at the surface of dentine; **D**: Detail of ganoine near the dentine layer showing some microtubercles on the right and elongate hollows on the left; **E**: Detail of ganoine at the surface of a ridge showing the thin elongate hollows. (d = dentine; g = ganoine). Scale bars: A = 500 μm ; B = 25 μm ; C = 100 μm ; D, E = 10 μm .

layer show numerous apertures at their surface (Fig. 2B, C) in contrast to types I and II.

Histology

Type I, *Adrianaichthys pankowskii* (Fig. 3A-D)

These scales show only two layers (Fig. 3A): 1) a superficial, pluristratified ganoine layer (Fig. 3B) that covers the

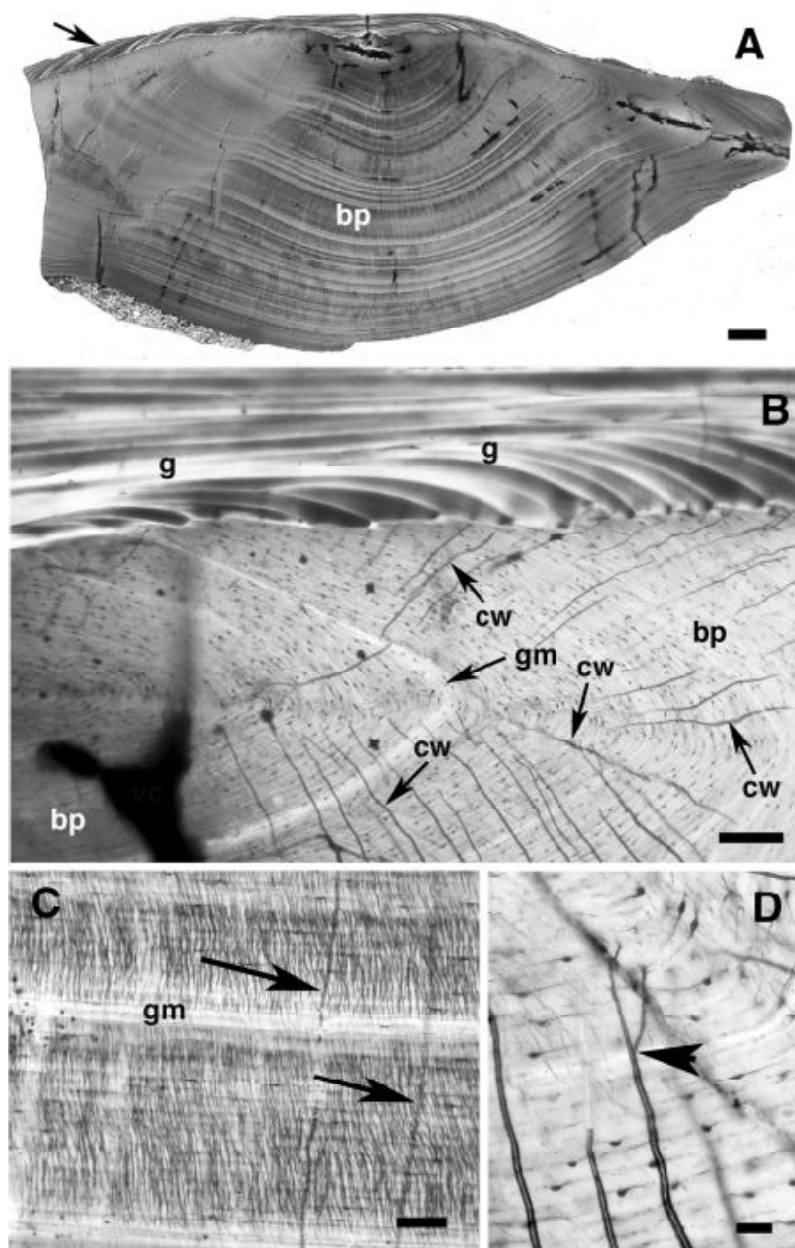


Figure 3. - Scales of *Adrianaichthys pankowski* (MNHN-Histos 1959). A: Cross section of a scale (transmitted natural light) showing two superimposed layers: pluristratified ganoine (black arrow), and basal plate (bp) constituted of an avascular bony tissue. Dentine is lacking; B-D: Cross sections of scales (transmitted natural light); B: Detail of pluristratified ganoine (g). In the underlying bony basal plate (bp) one can see canaliculi of Williamson (cw) and a growth mark (gm); C: Detail of the bony basal plate showing numerous Sharpey's fibres and two canaliculi of Williamson (arrow) and a growth mark (gm); D: Detail of the bony basal plate showing a dichotomy on a canaliculus of Williamson (arrowhead). Scale bars: A = 1 mm; B = 100 µm; C = 50 µm; D = 20 µm).

whole surface of the scale, except its posterior margin, and 2) a thick basal plate made of pseudolamellar bone (Fig. 3A, B). The bone is cellular and is crossed by numerous ascending canaliculi of Williamson (Fig. 3B, C), 2.5-4.0 µm in diameter; some of them are dichotomized (Fig. 3D). This basal plate is nearly avascular (Fig. 3A), and contains numerous Sharpey's fibres (Fig. 3C) and growth marks (Fig. 3B, C). Dentine has not been observed between the ganoine layer and the bony basal plate.

Type II, Obaichthys africanus (Fig. 4A-H).

The surface of the scales shows antero-posterior ridges (Figs 4A, B), covered by an uninterrupted layer of shiny ganoine, with the median ridge being more projected (Fig. 4A). Each ridge shows an accumulation of superposed ganoine strata (Fig. 4C). Under the ganoine is the dentine component (Fig. 4C) but with individualised concentrated units that sustain the ridges. These dentine units are organized around vascular canals (Fig. 4G) that may show loops (Fig. 4F); several dentine units are present under the well-developed ridges (Fig. 4C). In the groove that separates two ridges, the dentine units are thinner or missing. Under the dentine layer is a thick bony basal plate made of primary cellular bone with scarce vascular canals that are mostly restricted to the dentine units area (Fig. 4B, C). Conversely, the basal plate is crossed by numerous ascending canaliculi of Williamson (Fig. 4C, H), 2.5-5.5 µm in diameter; some of them cross the ganoine strata (Fig. 4D). Canaliculi of Williamson are frequently dichotomized (Fig. 4H). Obvious growth marks (Fig. 4C) indicate ecological seasonality. The ganoine layer shows rare traces of resorption of unknown ori-

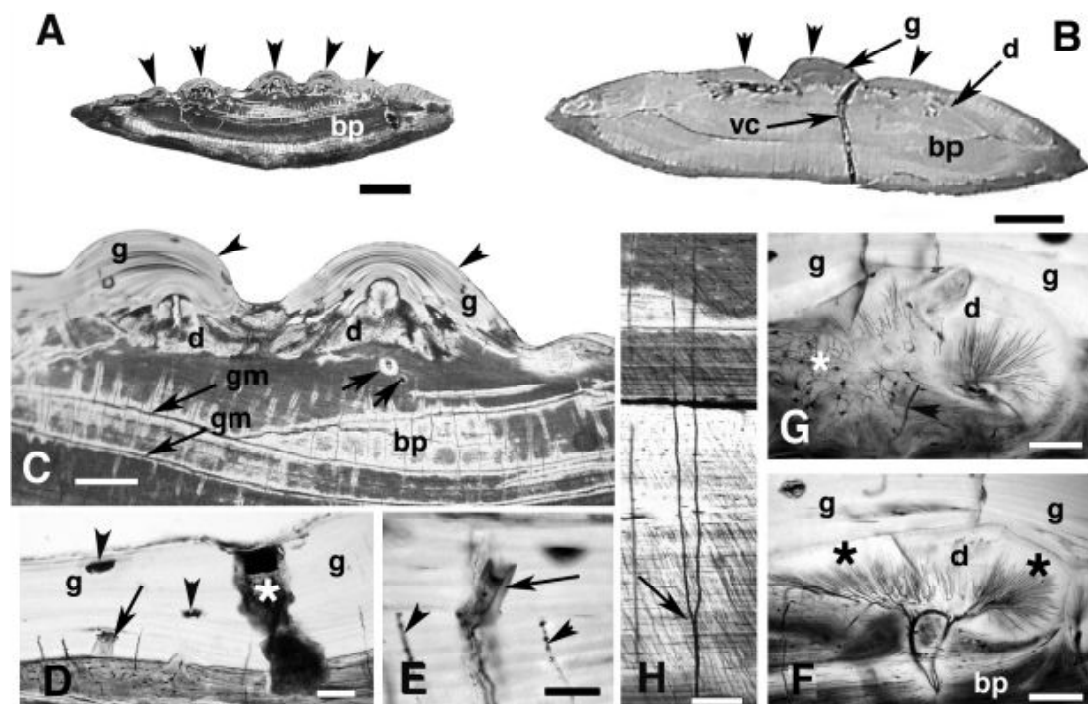


Figure 4. - Scales of *Obaichthys africanus* (MRS 45). **A-B**: Cross section of two scales (transmitted natural light), showing the three superimposed layers: pluristratified ganoine (**g**), dentine (**d**) and bony basal plate (**bp**); **A**: MNHN-Histos 1960. The arrowheads point to five ridges of ganoine. The basal plate (**bp**) is avascular; **B**: MNHN-Histos 1963. The arrowheads point to three ridges of ganoine. A vascular canal (**vc**) crosses the whole scale; **C-H**: Cross sections of scales (transmitted natural light); **C**: MNHN-Histos 1960. Detail of **A** showing the two median ridges (arrowheads) constituted of pluristratified ganoine (**g**), each one above a dentine unit (**d**). The two ridges lie on an avascular bony basal plate crossed by numerous canaliculi of Williamson. Two sections of vascular canals just below the right dentine unit are visible (arrows). Notice the growth marks (**gm**) in the basal plate (**bp**); **D**: MNHN-Histos 1964. Detail of the ganoine layer (**g**) showing two odontode bases (arrows) and a resorbed area (asterisk) characterized by its irregular alveolate walls. Two minor remodelling areas (arrowheads) are seen in the ganoine layer; **E**: MNHN-Histos 1964. Detail of an odontode base (arrow) in the ganoine layer. One can also show two canaliculi of Williamson crossing the ganoine strata (arrowheads); **F**: MNHN-Histos 1964. Detail of a dentine unit (**d**) organized above a vascular loop coming from the basal plate (**bp**), with numerous odontoblastic canaliculi (black asterisks). (**g** = ganoine); **G**: MNHN-Histos 1964. Detail of a dentine bulk (**d**) subtending a ganoine ridge (**g**). The odontoblastic canaliculi radiating from the vascular ramification are visible. A canaliculus of Williamson (arrowhead), and some osteocytes in the bony basal plate (white asterisk) are visible; **H**: MNHN-Histos 1963. Detail of the bony basal plate showing a dichotomized canaliculus of Williamson (arrow). Scale bars: **A**, **B** = 1 mm; **C** = 250 μ m; **D**, **F** = 100 μ m; **E** = 100 μ m).

Figure 5. - Scales of *Bawitius*. **A**: Cross section of a large scale (MNHN-Histos 1973) showing three patches of ganoine (**g**), the only two lateral ones being visible at the scale surface. Notice the growth marks in the basal plate (arrows) and the ascending vascular canals (arrowheads). **d**: dentine, **bp**: basal plate. **B**: Transverse section (MNHN-Histos 1967; natural transmitted light). Three superposed regions can be recognised from the surface to the deep: ganoine layer (arrowheads), dentine layer (**d**) and a bony basal plate (**bp**); the arrows point to wide vascular canals. **C**: MNHN-Histos 1967; polarized light. The plywood-like organisation (= clasmidine, white arrow) between the dentine layer (**d**) and the basal plate (**bp**) is visible. The basal plate is crossed by Sharpey's fibres (white asterisk). The square indicates the localization of **H**. **g**: ganoine; **D**: Cross section (MNHN-Histos 1983; natural transmitted light) of a small scale showing a ganoine ridge (**g**), bordered by the dentine layer (**d**) that shows numerous vascular canals (arrowheads); **E**: Cross section of a small scale (MNHN-Histos 1975). The upper half and the lower half of the section are respectively observed with polarized light and transmitted natural light. The regular organization of the lateral sides of the two stratified ganoine ridges show that patch organisation of ganoine does not result from a previous resorption. **d**: dentine; **g**: ganoine; **F**: Cross section of a small scale (MNHN-Histos 1979; natural transmitted light). Detail of the thick dentine layer. Numerous odontoblastic canaliculi (*), vascular canals (**vc**), primary denteones (**dtI**) and two secondary denteones (**dtII**) are visible; **G**: Detail of the inner part of dentine layer (MNHN-Histos 1972) that shows alternative opaque and lighted strata (black asterisk) above a secondary vascular cavity the bony wall of which is secondary bone (arrowheads); **H**: Cross section (MNHN-Histos 1967; natural transmitted light). Detail showing a secondary denteone (**OdII**) in the dentine layer (**d**), and two secondary osteones (black arrowheads) in the basal plate (**bp**) where we can also see Sharpey's fibres (white asterisks) and vascular canals (**vc**); **I**: Detail (MNHN-Histos 1973) of polarized osteocytes (arrows) on each side of a vascular canal (white asterisk). (scale bar = 50 μ m). **J**: Detail (MNHN-Histos 1983) showing an ascending vascular canal (**vc**) that is surrounded by polarized osteocytes (black arrowheads). Scale bars: **A**, **B** = 1 mm; **C**, **D** = 250 μ m; **E** = 200 μ m; **F-J** = 50 μ m).

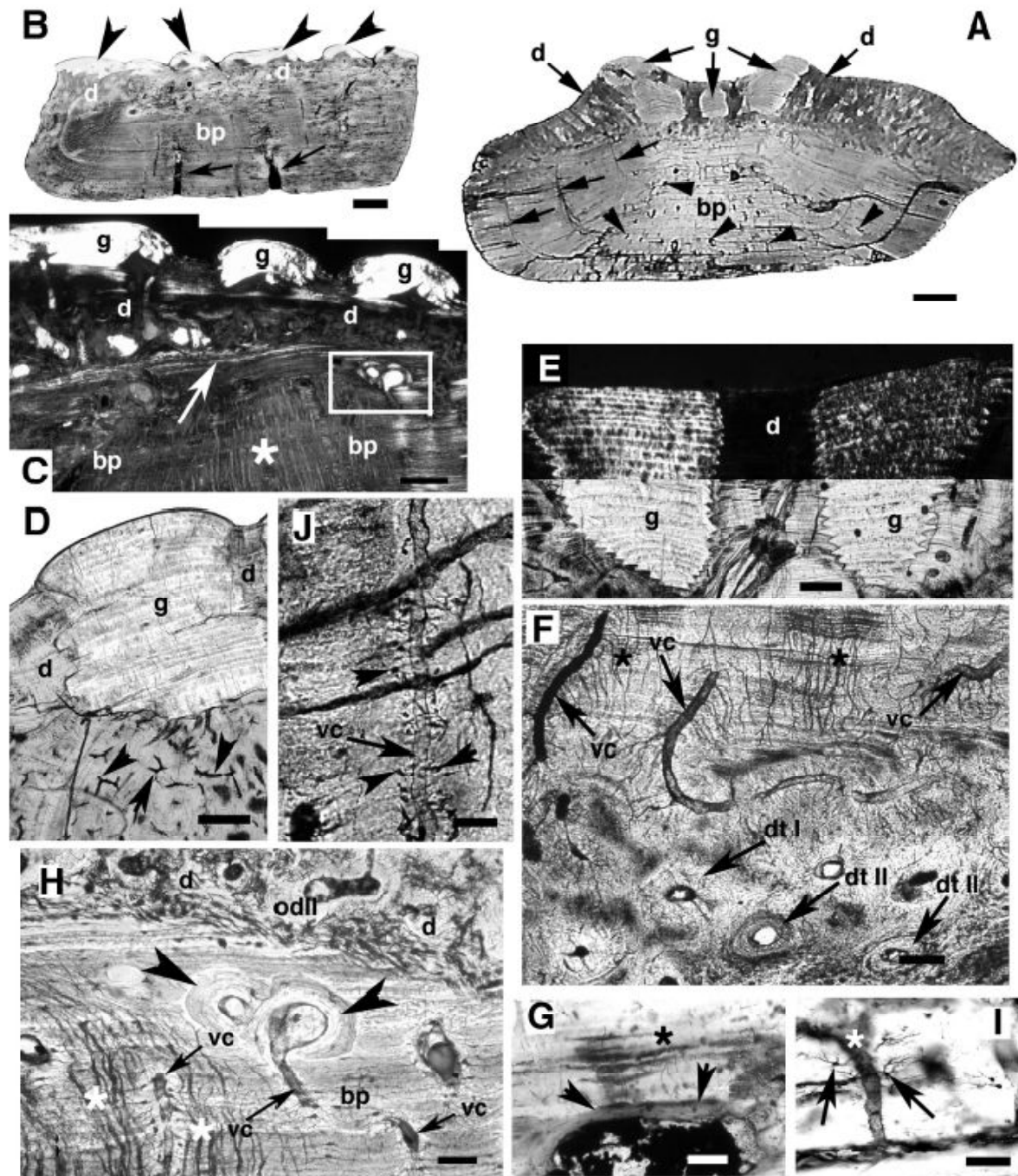


Figure 5. - Legends on opposite page.

gin, which are overlain by new ganoine deposits (Fig. 4D). Sometimes the erosive process affected the whole thickness of the ganoine layer and by places the underlying dentine (Fig. 4D). Odontodes are located within the ganoine. Their apex has been eroded before the deposit of new ganoine strata (Fig. 4D, E).

Types III and IV. Bawitius (Fig. 5A-J)

The large and small scales referred to the palaeoniscoid type are both formed of three main layers: 1) the surface of the scale bears either ramified ganoine rows or ganoine piles (Fig. 5A-C). In each case, ganoine is pluristratified and birefringent (Fig. 5B, C). The lateral sides of each strata end as a thin and sharp layer (Fig. 5E). As already noticed by Smith *et al.* (2006), the ganoine surface is perfectly smooth and deprived of microtubercles as described above. Such tubercles are generally present in polypterid and lepidosteoid scales (Gayet and Meunier, 1986; Meunier and Gayet, 1996; Daget *et al.*, 2001). 2) A thick vascularized dentine layer (Fig. 5B-D) crossed by numerous odontoblastic canalicles (Fig. 5F) developing from the vascular canal walls constituting primary denteones (Figs 5F, H). Secondary denteones (Figs 5G, H) resulting from a remodelling process of dentinous tissue are also present. On the scale surface, dentine separates ganoine patches (Fig. 5A, C, E). In areas not overlain by ganoine, the odontoblastic canalicles of dentine start from the scale surface. Some vascular canals emerge at the scale surface. In the middle region of the dentine layer, regularly arranged strata are visible as alternating light and dark layers (Fig. 5C, G). 3) A thick basal plate made of cellular pseudo-lamellar bone (Figs 5A-C, H) and showing many ascending vascular canals (Figs 5A, B), some of which are connected to the vascular network of the dentine layer. These ascending canals of the basal plate are surrounded by polarized osteocytes lacunae (Fig. 5I, J). In the basal plate, there are also numerous Sharpey's fibres (Fig. 5C, H), which represent ligaments fastening the scale to their neighbouring ones and/or to the stratum compactum of the dermis. On some sections (not shown), obvious growth marks indicate ecological seasonality. Canaliculi of Williamson are lacking. Secondary vascular canals, the walls of which are constituted of secondary bone, are separated from the surrounding primary bone by cementing lines (Fig. 5F, H).

DISCUSSION

Adrianaichthys pankowskii

Lepidotes was used as a wastebasket and non-monophyletic genus gathering numerous species. The type-species is *L. gigas* from the Early Jurassic and the other species referred on sound systematic reasons are also early Jurassic in age (López-Arbarello, 2012). During the last years, some

Late Jurassic species previously referred to *Lepidotes* have been attributed to other genera (i.e. López-Arbarello and Sferco, 2011). In the Early Cretaceous, most *Lepidotes* species were also referred to other genera and most of them are included in the Lepisosteiformes, a clade of ginglymodians containing the extant gars (Cavin, 2010; Cavin *et al.*, 2013; Deesri *et al.*, 2014). *Adrianaichthys pankowskii* constitutes a new occurrence of a lepisosteiform in the Cretaceous.

Obaichthys africanus

Dentine. – The organisation of the scales with three layers (ganoine, dentine, bony basal plate) is typical of the palaeoniscoid type as defined by Goodrich (1907). This author also defined the lepidosteoid type on the basis of absence of dentine, which is the situation present in all extant Lepisosteidae. Although *Obaichthys africanus* is clearly a lepisosteiform on the basis of osteological characters, the thick dentine layer in its scales does not fit with the definition of the lepidosteoid type, which is normally present in this group. Dentine has also been observed in the scales of South American extinct obaichthyids (Brito *et al.*, 2000). Nevertheless, in *O. africanus*, the dentine units are more developed than in the scales of *O. decoratus* and *Dentilepisosteus laevis* (Brito *et al.*, 2000). On the basis of this feature, *O. africanus* appears more primitive than *O. decoratus* and of *Dentilepisosteus laevis*, which are, however, less derived than the extant Lepisosteidae *Lepisosteus* and *Atractosteus*, which both possess typical lepidosteoid scales.

Odontodes in the ganoine layer. – The first descriptions of lepidosteoid scales already mentioned the presence of odontodes fixed on the external ganoine layer (Williamson, 1849; Nickerson, 1893). This observation was confirmed on the scales of *Lepisosteus oculatus* (Sire, 1994). In aspidorhynchid scales, odontodes are also present on the ganoine surface (Brito and Meunier, 2000) as well as in polypterid scales (Hertwig, 1879; Géraudie, 1988), although in the latter they are often temporary. Our study shows that the scales of *O. africanus* had odontodes at their ganoine surface. These superficial odontodes were partly resorbed before the deposit of a new stratum of ganoine that covers their base. Contrary to *O. africanus*, however, the scales of *O. decoratus* and *Dentilepisosteus laevis* do not show odontodes imbedded within the ganoine (Brito *et al.*, 2000).

Bawitius

Weiler (1935) attributed to *Stromerichthys* isolated maxillae from Bahariya that Cavin *et al.* (2015) later referred to a polypterid, possibly *Bawitius* Grandstaff *et al.*, 2012. A fragment of a maxilla similar in shape was also described from the Kem Kem beds in Morocco (Cavin *et al.*, 2015). Schaal (1984) attributed an isolated ectopterygoid from Bahariya to *Polypterus? bartheli* and Grandstaff *et al.* (2012) later coined the genus *Bawitius* for this species. In Bahariya iso-

lated scales similar to those described here were referred to a polypterid (Stromer, 1925, 1936; Schaal, 1984; Grandstaff *et al.*, 2012). In the Kem Kem beds, Dutheil (1999a) recorded the occurrence of polypterids represented by isolated pinulae and he described a small species of polypterid, *Serenoichthys kemkemensis* Dutheil, 1999b from a clay lens called OT1 interpreted as a quiet lake or pool. Cavin *et al.* (2015) and Benyoucef *et al.* (2015) referred scales similar to those described here from the Kem Kem beds in Morocco and from coeval beds in the Bechar basin in Algeria, respectively, to a polypterid, possibly *Bawitius*. Therefore, the scales described here are referred to *Bawitius* Grandstaff *et al.*, 2012.

Contrary to the opinion of Smith *et al.* (2006), we do not regard as secondary and resulting from a resorption of a primary continuous ganoine layer, the interrupted surface of ganoine in the scales referred here to *Bawitius*. This interrupted arrangement of ganoine is instead the standard and original state in this genus. This interpretation rests on the absence of resorption traces, which should have been present either in the lateral sides of the ganoine patches or in any stratum at the surface of a pile. On the contrary, the scales of *Callipurbeckia tendaguriensis*, for example, show typical resorption lacunae (= Howship's lacunae) on their ganoine surface (Arratia and Schultze, 1999, fig. 12). Moreover the dentine that fringes the ganoine is also deprived of resorption traces that normally appear as discontinuities in the structure (compare our Fig. 3E to the scales of *Lepidotyle* in Meunier and Gayet, 1992, figs 9–12). Moreover, no scales showing a regular continuous surface of ganoine associated with the characteristic histological organisation of a “palaeonisciform” fish have been found in the Kem Kem beds, an observation that reinforces our hypothesis of an initial discontinuity rather than a resorption of the ganoine.

In the two palaeoniscoid-types of scales, we observed the presence of a plywood-like organisation of collagen fibres. The regular arrangement of these strata, located between the dentine layer and the bony basal plate, has been recorded in the scales of extant Polypteriformes (see Sire 1989, 1990), as well as in fossil ones (Gayet and Meunier, 1991; Meunier and Gayet, 1996; Daget *et al.*, 2001). This observation is strengthened by the presence of polarized osteocytes that surround the ascending vascular canals as described in a number of Polypteriformes. This peculiar organisation has been first noticed in several fossil Palaeonisciformes (Schultze, 1968; Ørvig, 1978), in extant polypterids (Ørvig, 1957; Sire, 1989, 1990) and then in fossil Polypteriformes (Meunier and Gayet, 1996). Our isolated scales from the Tabaste's collection and from new collection from the Kem Kem beds resemble various other scale material described in the literature, such as the Cenomanian of Bahariya, Egypt (Stromer, 1925, 1936; Smith *et al.*, 2006), and the lower Cre-

taceous of Ubangui formation (Congo) (Casier, 1961: Pl IV, figs 10, 11).

The studied thick rhomboid “patches” and “ridged” scales from upper Cretaceous Moroccan Sahara, with the three superimposed layers – ganoine, dentine and bony basal plate – are ‘true’ ganoid scales (Goodrich, 1907; Kerr, 1952; Schultze, 1977; Meunier, 1980; Sire *et al.*, 2009). But the important reduction of the superficial shiny ganoine, forming either parallel ridges, with or without ramifications, or thick irregular patches, gives them an original status among the ganoid scales. The bony basal plate of the two series of scales is totally devoid of canaliculi of Williamson. Consequently, this fossil material cannot be allocated to a holostean fish, which are characterized by the occurrence of such canaliculi (Nickerson, 1893; Goodrich, 1913; Ørvig, 1951; Moss, 1964; Schultze, 1966; Francillon-Vieillot *et al.*, 1990; Sire and Meunier, 1994; Meunier, 2011). Accordingly, the attribution of these scales by Tabaste (1963) and Weiler (1935) to semionotids is wrong. In return, the three described layers in types III and IV fit well with a palaeoniscoid scale type (Goodrich, 1907; Schultze, 1968, 1977, 1996; Meunier, 1980; Meunier and Brito, 2004; Sire *et al.*, 2009). These scales, moreover, share characters with the polypteriforms: *i*) in the basal plate, there are ascending vascular canals surrounded by osteocytes closed to the osteocytic canaliculi, which are polarized. Such an organisation has already been described in the scales of the palaeoniscid *Scanilepis* (Ørvig, 1978) and in the polypteriform *Latinopolia* (Meunier and Gayet, 1996, 1998); it is also known in extant Polypteridae (Meunier and Gayet, 1996; Daget *et al.*, 2001); *ii*) there is an elasmodine layer (Schultze, 1996; Sire *et al.*, 2009), a plywood-like organisation of collagenous fibres between the dentine layer and the oldest part of the bony basal plate (Fig. 5C, G). Such a structure has been first described in the scales of the extant polypterid *Polypterus senegalus* (Sire, 1989, 1990). Later this typical elasmodine layer has been also observed in various fossil Polypteridae from the Cretaceous of Africa (Gayet *et al.*, 1988; Daget *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2006), in *Dagetella sudamericana* (Gayet and Meunier, 1992) and *Latinopolia suarezi* (Meunier and Gayet, 1996) from the Cretaceous of Bolivia, and in *Bartschichthys* sp. from Maranhão state of Brazil (Dutra and Malabarba, 2001). The elasmodine is regarded as an autapomorphy of the Polypteriformes. Consequently, the presence of a plywood like organisation between the dentine layer and the bony basal plate provides further evidence to include *Bawitius* into Polypteriformes (Daget *et al.*, 2001).

The absence of morphological and histological differences between the structure of large and small scales of types III and IV indicates that both kinds likely belong to the same taxon, possibly *Bawitius*. Presence of an interrupted ganoine layer in the small scales, i.e. from young individuals, is fur-

ther evidence that the ganoine is not resorbed during ontogeny.

Acknowledgements. – We are grateful to the Laboratoire de Paléontologie (Département Sciences de la Terre, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris) that allowed the first author to study the material collected by N. Tabaste. We thanks Claude Ferrara for the macrophotographs, Vincent Romevaux (MNHN, Paris), Pierre-Alain Proz (MHN, Genève) for their technical assistance for the ground sections, and Sylvain Pont (service SEM-EDS de la Direction des Collections du Muséum national d'Histoire naturelle, Paris) for SEM pictures. This research was partly funded by grants from the Swiss National Science Foundation (SNSF 129923 and 146868). We are also very grateful to the anonymous referees who greatly helped us to improve our manuscript.

REFERENCES

- ARRATIA G. & SCHULTZE H.-P., 1999. - Semionotiform fish from the Upper Jurassic of Tendaguru (Tanzania). *Mitt. Mus. Nat.kd. Berl., Geowiss. Reihe*, 2: 135-153.
- BENYOUCHEF M., LÄNG E., CAVIN L., MEBARKI K., ADACI M. & BENSALAH M., 2015. - Overabundance of piscivorous dinosaurs (Theropoda: Spinosauridae) in the mid-Cretaceous of North Africa: The Algerian dilemma. *Cretaceous Res.*, 55: 44-55.
- BERMÚDEZ-ROCHAS D.D. & POYATO-ARIZA F.J., 2015. - A new semionotiform actinopterygian fish from the Mesozoic of Spain and its phylogenetic implications. *J. Syst. Palaeontol.*, 13(4): 265-285.
- BRITO P.M. & MEUNIER F.J., 2000. - The morphology and histology of the scales of Aspidorhynchids (Actinopterygii, Halecostomi) and their phylogenetical implications. *Geobios*, 33: 105-111.
- BRITO P.M., MEUNIER F.J. & GAYET M., 2000. - The morphology of the scales of the Cretaceous gar *Obaichthys* (Actinopterygii, Lepisosteidae): phylogenetical implications. *C. R. Acad. Sci., sér. IIa*, 331: 823-829.
- CASIER E., 1961. - Matériaux pour la faune ichtyologique éocénétique du Congo. *Mus. R. Afr. Cent., Tervuren, Belg. Ann.*, sér. 8, 39: 1-96 (Pl I-XII).
- CAVIN L., 2010. - Diversity of Mesozoic semionotiform fishes and the origin of gars (Lepisosteidae). *Naturwissenschaften*, 97: 1035-1040.
- CAVIN L. & BRITO P.M., 2001. - A new Lepisosteidae (Actinopterygii: Ginglymodi) from the Cretaceous of the Kem Kem beds, southern Morocco. *Bull. Soc. Géol. Fr.*, 172(5): 661-670.
- CAVIN L. & FOREY P.L., 2004. - New mawsoniid coelacanth (Sarcopterygii: Actinistia) remains from the Cretaceous of the Kem Kem beds, Southern Morocco. In: *Mesozoic Fishes 3 - Systematics, Paleoenvironments and Biodiversity* (Arratia G. & Tintori A., eds), pp. 493-506. Munich: Verlag Dr. Friedrich Pfeil.
- CAVIN L. & FOREY P.L., 2008. - A new tselfatiiform teleost from the Upper Cretaceous (Cenomanian) of the Kem Kem beds, Southern Morocco. In: *Mesozoic Fishes 4 - Homology and Phylogeny* (Arratia G. & Tintori A., eds), pp. 199-216. Munich: Verlag Dr. Friedrich Pfeil.
- CAVIN L., DEESRI U. & SUTEETHORN V., 2009. - The Jurassic and Cretaceous bony fish record (Actinopterygii, Dipnoi) from Thailand. *Geol. Soc. Lond., Spec. Publ.*, 315: 125-139.
- CAVIN L., DEESRI U. & SUTEETHORN V., 2013. - Osteology and relationships of *Thaichthys* nov. gen.: a Ginglymodi from the Late Jurassic-Early Cretaceous of Thailand. *Palaeontology*, 56: 183-208.
- CAVIN L., BOUDAD L., TONG H., LÄNG E., TABOUELLE J. & VULLO R., 2015. - Taxonomic composition and trophic structure of the continental bony fish assemblage from the Early Late Cretaceous of Southeastern Morocco. *PLoS ONE*, 10(5): e0125786.
- DAGET J., GAYET M., MEUNIER F.J. & SIRE J.-Y., 2001. - Major discoveries on the dermal skeleton of fossil and recent polypteriformes: a review. *Fish Fish.*, 2: 113-124.
- DEESRI U., LAUPRASERT K., SUTEETHORN V., WONGO K. & CAVIN L., 2014. - A new Ginglymodian fish (Actinopterygii, Holostei) from the Late-Jurassic Phu Kradung Formation, northeastern Thailand. *Acta Palaeontol. Polon.*, 59: 313-331.
- DUTHEIL D.B., 1996. - The first articulate fossil cladistian: *Sere-noichthys kemkemensis*, gen. et sp. nov. (Actinopterygii: Cladistia) from the Cretaceous of Morocco. *J. Vert. Paleontol.*, 19: 243-246.
- DUTHEIL D.B., 1999a. - An overview of the freshwater fish fauna from the Kem Kem beds (Late Cretaceous: Cenomanian) of southeastern Morocco. In: *Mesozoic Fishes 2 - Systematics and Fossil Record* (Arratia G. & Tintori A., eds), pp. 553-563. Munich: Verlag Dr. Friedrich Pfeil.
- DUTHEIL D.B., 1999b. - The first articulated fossil cladistian: *Sere-noichthys kemkemensis*, gen. et sp. nov., from the Cretaceous of Morocco. *J. Vert. Paleontol.*, 19(2): 243-246.
- DUTRA M.F.A. & MALABARBA M.C.S.L., 2001. - Pexes do Albiano-Cenomaniano do Grupo Itape curu no estado do Maranhão, Brasil. In: *O Cretáceo na Bacia de São Luís-Grajaú* (Rossetti D., Goeas A. & Truckenbrost W., eds), pp. 191-208. Belém: Mus Para Emílio Goeldi.
- FILLEUL A. & DUTHEIL D.B., 2001. - *Spinocandichthys oumtkoutensis* a freshwater acanthomorph from the Cenomanian Morocco. *J. Vert. Paleontol.*, 21(4): 774-780.
- FILLEUL A. & DUTHEIL D.B., 2004. - A peculiar diplospondylous actinopterygian fish from Cretaceous of Morocco. *J. Vert. Paleontol.*, 24(2): 290-298.
- FOREY P.L. & CAVIN L., 2007. - A new species of *Cladocyclostus* (Teleostei, Ichthyodectiformes) from the Cenomanian of Morocco. *Palaeont. Electron.*, 10(3): 12A: 1-10.
- FOREY P.L., LÓPEZ-ARBARELLO A. & MACLEOD N., 2011. - A new species of *Lepidotes* (Actinopterygii: Semionotiformes) from the Cenomanian (Upper Cretaceous) of Morocco. *Palaeont. Electron.*, 14(1): 7A: 1-12.
- FRANCILLON-VIEILLOT H., BUFFRÉNIL V. (de), CASTANET J., GÉRAUDIE J., MEUNIER F.J., SIRE J.-Y., ZYLBERBERG L. & RICQLÈS A. (de), 1990. - Microstructure and mineralization of Vertebrate skeletal tissues. In: *Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes and Evolutionary Trends* (Carter J.G., ed.), Vol. 1: pp. 471-530. New-York: Van Nostrand Reinhold.
- GAYET M. & MEUNIER F.J., 1986. - Apport de l'étude de l'ornementation microscopique de la ganoïne dans la détermination de l'appartenance générique et/ou spécifique d'écaillés isolées chez les Actinoptérygiens. *C. R. Acad. Sci.*, 303: 1259-1262.
- GAYET M. & MEUNIER F.J., 1991. - First discovery of Polypteridae (Pisces, Cladistia, Polypteriformes) outside of Africa. *Geobios*, 24: 463-466.
- GAYET M. & MEUNIER F.J., 1992. - Polyptérides (Pisces, Cladistia) du Maastrichtien et du Paléocène de Bolivie. *Geobios*, émun. sp., 14: 159-168.

- GAYET M., MEUNIER F.J. & LEVRAT-CALVIAC V., 1988. - Mise en évidence des plus anciens Polypteridae dans le gisement sénonien, d'In Becetem (Niger). *C. R. Acad. Sci.*, 307: 205-210.
- GÉRAUDIE J., 1988. - Fin structural peculiarities of the pectoral fin dermoskeleton of two Brachiopterygii, *Polypterus senegalus* and *Calamoichthys calabaricus* (Pisces, Osteichthyes). *Anat. Rec.*, 221: 455-468.
- GOODRICH E.S., 1907. - On the scales of fish, living and extinct, and their importance in classification. *Proc. Zool. Soc. Lond.*, 2: 751-774.
- GOODRICH E.S., 1913. - On the structure of bone in fishes: a contribution to palaeohistology. *Proc. Zool. Soc. Lond.*, 80-85.
- GRANDE L., 2010. - An empirical synthetic pattern study of gars (Lepisosteiformes) and closely related species, based mostly on skeletal anatomy: the resurrection of Holostei. *Copeia, Spec. Publ.*, 6: 1-863.
- GRANDSTAFF B.S., SMITH J.B., LAMANNA M.C., LACOVARA K.J. & ABDEL-GHANI M.S., 2012. - *Bawitius*, gen. nov., a giant Polypterid (Osteichthyes, Actinopterygii) from the Upper Cretaceous Bahariya Formation of Egypt. *J. Vert. Paleontol.*, 32(1): 17-26.
- HERTWIG O., 1879. - Ueber das Hautskelet der Fische. Das Hautskelet der Ganoiden (*Lepidosteus* und *Polypterus*). *Morph. Jahrb.*, 5: 1-21 (3 pl.).
- JANVIER P., 1996. - Early Vertebrates. 393 p. Clarendon Press, Oxford Science Publ.
- JONET S., 1971. - Présence du poisson ganoïde *Stromerichthys aethiopicus* Weiler dans le Cénomanien portugais. *Bol. Soc. Portug. Cienc. Nat.*, 213: 33-38.
- KERR T., 1952. - The scales of primitive living Actinopterygians. *Proc. Zool. Soc. Lond.*, 122: 55-78.
- KHALLOUFIB., BRITO P.M., CAVIN L. & DUTHEIL D.B., in press. - Revue des ichthyofaunes mésozoïques et cénozoïques marocaines. *Mém. Soc. Géol. Fr.*, 180.
- LE LOEUFF J., MÉTAIS E., DUTHEIL D.B., RUBINO J.L., BUF-FETAUT E., LAFONT F., CAVIN L., MOREAU F., TONG H., BLANPIED C. & SBETA A., 2010. - An Early Cretaceous vertebrate assemblage from the Cabao Formation of NW Libya. *Geol. Mag.*, 147(5): 750-759.
- LÓPEZ-ARBARELLO A., 2012. - Phylogenetic interrelationships of Ginglymodian fishes (Actinopterygii: neopterygii). *PLoS ONE*, 7(7): e39370.
- LÓPEZ-ARBARELLO A. & SFERCO E., 2011. - New semionotiform (Actinopterygii: Neopterygii) from the Late Jurassic of southern Germany. *J. System. Palaeontol.*, 9: 197-215.
- MEUNIER F.J., 1980. - Recherches histologiques sur le squelette dermique des Polypteridae. *Arch. Zool. Gén. Exp.*, 121: 279-295.
- MEUNIER F.J., 2011. - The Osteichthyes, from the Paleozoic to the extant time, through histology and paleohistology of bony tissues. *C. R. Acad. Sci., Palevol*, 10: 347-355.
- MEUNIER F.J. & BRITO P.M., 2004. - Histology and morphology of the scales in some extinct and extant teleosts. *Cybium*, 28(3): 225-235.
- MEUNIER F.J. & GAYET M., 1992. - Remaniement de la ganoïne chez un Semionotidae du Crétacé supérieur de Bolivie: intérêt paléobiologique. *Geobios*, 25: 767-774.
- MEUNIER F.J. & GAYET M., 1996. - A new Polypteriforme from the Late Cretaceous and the middle Paleocene of South America. In: Mesozoic Fishes. Systematics and Palaeoecology. (Arratia G. & Viehl G., eds.), pp. 95-103. München: Verlag Dr. F. Pfeil.
- MEUNIER F.J. & GAYET M., 1998. - Rectification of the nomenclature of the genus name *Politia* Meunier & Gayet, 1996 (Osteichthyes, Cladistia, Polypteriformes) in *Latinopolitia* nom. nov. *Cybium*, 22(2): 192.
- MOSS M.L., 1964. - Development of cellular dentin and lepidosteal tubules in the bowfin, *Amia calva*. *Acta Anat.*, 58: 333-354.
- NICKERSON W.S., 1893. - The development of the scales of *Lepidosteus*. *Bull. Mus. Comp. Zool.*, 24: 115-139.
- ØRVIG T., 1951. - Histologic studies of placoderms and fossil Elasmobranchs. 1: The endoskeleton, with remarks on the hard tissues of lower vertebrates in general. *Ark. Zool.*, 2(2): 321-454 (8 Pl.).
- ØRVIG T., 1957. - Paleohistological notes. I. On the structure of the bone tissue in the scales of certain Palaeoniscoiformes. *Ark. Zool.*, 10: 481-490.
- ØRVIG T., 1978. - Microstructure and growth of the dermal skeleton in fossil actinopterygian fishes: *Birgeria* and *Scanilepis*. *Zool. Scripta*, 7: 33-56.
- SCHAAL S., 1984. - Oberkreatazische Osteichthyes (Knochenfische) aus dem Bereich von Bahariya und Kharga, Ägypten, und ihre Aussagen zur Paläökologie und Stratigraphie. - *Berliner Geowissen. Abh., Reihe A: Geol. Paläont.*, 53: 1-79.
- SCHULTZE H.-P., 1966. - Morphologische und histologische Untersuchungen an Schuppen mesozoischer Actinopterygier (Übergang von Ganoid- zu Rundschuppen). *Neues Jahrb. Geol. Paläont.*, 126: 232-314.
- SCHULTZE H.-P., 1968. - Palaeoniscoidea Schuppen aus dem Unterdevon Australiens und Kanadas und aus dem Mitteldevon Spitzbergens. *Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.)*, Geol., 16: 341-368.
- SCHULTZE H.-P., 1977. - Ausgangsform und Entwicklung der rhombischen Schuppen der Osteichthyes (Pisces). *Paläontol. Zeit.*, 51: 152-168.
- SCHULTZE H.-P., 1996. - The scales of Mesozoic Actinopterygians. In: Mesozoic Fishes: Systematics and Palaeoecology (Arratia G. & Viehl G., eds.), pp. 83-93. München: Verlag Dr. F. Pfeil.
- SIRE J.-Y., 1989. - Scales in young *Polypterus senegalus* are elasmoid: new phylogenetic implications. *Am. J. Anat.*, 186: 315-323.
- SIRE J.-Y., 1990. - From ganoid to elasmoid scales in the actinopterygian fishes. *Neth. J. Zool.*, 40: 75-92.
- SIRE J.-Y., 1994. - Light and TEM study of non regenerated and experimentally regenerated scales of *Lepisosteus oculatus* (Holostei) with particular attention to ganoin formation. *Anat. Rec.*, 240: 189-207.
- SIRE J.-Y. & MEUNIER F.J., 1994. - The canaliculi of Williamson in Holostean bone (Osteichthyes, Actinopterygii): A structural and ultrastructural study. *Acta Zool.*, 75: 235-247.
- SIRE J.-Y., DONOGHUE P.C.J. & VICKARYOUS M.K., 2009. - Origin and evolution of the integumentary skeleton in non-tetrapod vertebrates. *J. Anat.*, 214: 409-440.
- SMITH J.B., GRANDSTAFF B.S. & ABDEL-GHANI M.S., 2006. - Microstructure of polypterid scales (Osteichthyes: Actinopterygii: Polypteridae) from the Upper Cretaceous Bahariya Formation, Bahariya Oasis, Egypt. *J. Paleont.*, 80: 1179-1185.
- STROMER E., 1925. - Der Rückgang der Ganoidfische von der Kreidezeit an. *Z. Deutsche Geolog. Gesell.*, 77: 348-371.
- STROMER E., 1936. - Ergebnisse der Forschungsreisen Prof. E. Stromer's in den Wüsten Ägyptens. VII. Baharije-Kessel und -Stufe mit deren Fauna und Flora. Eine ergänzende Zusammenfassung. *Abh. Bayer. Akad. Wissens., Math.-Natur. Abt., Neue Folge*, 33: 1-102.

- TABASTE N., 1963. - Étude de restes de poissons du Crétacé saharien. *Mém. IFAN*, 68: 438-434.
- TORICES A., BARROSO-BARCENILLA F., CAMBRA-MOO O., PÉREZ-GARCÍA A. & SEGURA M., 2012. - Palaeontological and palaeobiogeographical implications of the new Cenomanian vertebrate site of Algora, Guadajara, Spain. *Cretaceous Res.*, 37: 231-239.
- VULLO R., BERNÁRDEZ E. & BUSCALIONI A.D., 2009. - Vertebrates from the middle?-late Cenomanian La Cabaña Formation (Asturias, northern Spain): palaeoenvironmental and palaeobiogeographic implications. *Palaeogeogr., Palaeoclimat., Palaeoecol.*, 276: 120-129.
- WEILER W., 1935. - Ergebnisse der Forshungreisen Prof. E. Stromer's in den Wüsten Aegyptens. II. Wirbeltierreste der Baharije-Stufe (Unterstes Cenoman). XVI. Neue Untersuchungen an den Fischresten. *Abh. Bayer. Akad. Wiss., Math.-Natur.*, 32: 1-57.
- WERNER C., 1993. - Late Cretaceous continental vertebrate faunas of Niger and northern Sudan. In: Geoscientific Research in Northeast Africa (Thorweihe & Schandel Meier, eds), pp 401-405. Rotterdam: Balkema.
- WILLIAMSON W.C., 1849. - On the microscopic structure of the scales and dermal teeth of some ganoid and placoid fish. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.*, 139: 435-475.

De la découverte d'un actinoptérygien sémionotiforme du Jurassique de France à l'étude histologique fine des écailles ganoïdes.

René-Paul EUSTACHE

RESUME

La découverte d'un spécimen sub-complet d'actinoptérygien sémionotiforme dans les falaises du Bec de Caux (76) en novembre 2008, m'a poussé à entreprendre des recherches sur l'histologie et l'ornementation des écailles ganoïdes.

Il s'agit d'écailles osseuses recouvertes d'une couche d'émail, la ganoïne. Elle est ornée de microtubercules, reliefs microscopiques dont l'agencement varie en fonction des espèces.

Une première partie est consacrée à l'étude histologique des écailles du spécimen que j'ai découvert. Peu vascularisées, elles présentent des traces de dentine au niveau de l'*initium* et de manière inhomogène à l'interface avec la ganoïne. Elles sont parcourues par des *canaliculi* de Williamson dont certaines des terminaisons sont en connexion avec la dentine. Ils sont issus de cellules spécialisées de nature osseuse et leur interaction avec la dentine apparaît surprenante. Cela m'a conduit à revisiter la notion de « canal vasculaire de Williamson » introduite par Ørvig.

Dans la deuxième partie je présente une nouvelle méthode d'étude des microtubercules. Celle-ci est basée sur l'observation en microscopie optique par contraste de phase de répliques de la surface d'écailles (peels). J'ai élaboré un traitement semi-automatisé des images numériques afin d'extraire des descripteurs quantitatifs de l'ornementation. Elle présente de nombreux avantages au regard de la méthode précédemment développée, basée sur l'observation directe des écailles en microscopie électronique à balayage. Elle s'affranchit de l'étape de prélèvement d'une écaille. Elle est également plus robuste et permet de traiter un grand nombre de microtubercules dans le cadre d'une analyse statistique affinée.

J'illustre l'intérêt de ma méthode à travers quelques exemples d'étude de l'ornementation d'écailles actuelles et fossiles. Enfin je conclus en proposant une fonction nouvelle pour cette ornementation microscopique. Ces reliefs pourraient participer au renforcement de la résistance mécanique de l'écaille en améliorant l'adhésion des différentes strates de ganoïne entre elles.

Mots-clefs : *Lepidotes*, écaille, ganoïne, microtubercule, histologie, peel.

